

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Prof. Dr. Rolf Felix Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Rolle der CDR-H3-Region
in einem murinen Modell
der chronischen allergischen
Atemwegsentzündung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Kathrin Preißer
aus Lich

Marburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 12.09.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Rolf F. Maier

Korreferent: Dr. Andreas Nockher

Meiner Familie gewidmet

1 Zusammenfassung	6
2 Einleitung	8
2.1 Das allergische Asthma bronchiale	8
2.1.1 Definition und Hinführung	8
2.1.2 Systemische Sensibilisierung	9
2.1.3 Pathophysiologie der allergischen Atemwegsentzündung	13
2.1.4 Atemwegshyperreagibilität	15
2.1.5 Irreversibler Atemwegsumbau (<i>Airway Remodelling</i>)	16
2.2 Entstehung der Antikörpervielfalt	18
2.3 Allergen-Antikörper-Interaktion	21
2.4 Die Rolle der CDR-H3 Region im allergischen Asthma	24
2.5 Das Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung	24
2.6 Fragestellung	26
3 Material und Methoden	28
3.1 Mausmodell des allergischen Asthma bronchiale	28
3.1.1 Tierhaltung und Tierzucht	28
3.1.2 Transgene Tiere mit qualitativ veränderter CDR-H3	28
3.1.3 Gewinnung genetischen Materials	29
3.1.4 Genotypisierung	29
3.1.5 Allergische Sensibilisierung und Induktion der Atemwegsentzündung	32
3.2 Serumgewinnung	34
3.3 ELISA	35
3.4 Bronchoalveoläre Lavage	37
3.4.1 Durchführung der Bronchoalveolären Lavage	37
3.4.2 Zytozentrifugation (Zytospin) und morphologische Klassifizierung	38
3.5 Messung der Atemwegsfunktion	39
3.5.1 Messprinzip Head-out Bodyplethysmographie	39
3.5.2 Methacholin-Provokation	41
3.6 Quantitative Histologie	42
3.6.1 Stereologie	43
3.6.2 Vorbereitung der Lungen	44
3.6.3 Herstellung von histologischen Lungenschnitten	44
3.7 Statistik	46
4 Ergebnisse	47
4.1 Sensibilisierung auf Ovalbumin	47
4.1.1 IgM-Spiegel	47
4.1.2 IgG ₁ -Spiegel	49
4.1.3 IgE-Spiegel	51
4.1.4 IgG _{2A} -Spiegel	53
4.1.5 OVA-spezifisches IgE	55
4.2 Entzündungsreaktion	57
4.2.1 Zellverteilung in der BAL	57
4.2.2 Interleukin 5 in der BAL	59
4.3 Lungenfunktion	60
4.4 Quantitative Histologie	64

5 Diskussion	66
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	66
5.2 Kritische Betrachtung des verwendeten Modells	67
5.3 Rolle der CDR-H3-Region bei der allergischen Immunantwort	68
5.3.1 Bedeutung der CDR-H3-Region für die systemische Sensibilisierung	68
5.3.2 Bedeutung der CDR-H3-Region für die allergische Atemwegsentzündung	70
5.3.3 Bedeutung der CDR-H3-Region für die AHR	72
5.3.4 Irreversibler Atemwegsumbau	74
5.4 Schlussfolgerung	77
6 Anhang	79
6.1 Literaturverzeichnis	79
6.2 Abbildungsverzeichnis	97
6.3 Tabellenverzeichnis	99
6.4 Abkürzungsverzeichnis	99
6.5 Eigene Publikationen zum Thema	100
6.6 Englische Zusammenfassung	101
6.7 Verzeichnis akademischer Lehrer	102
6.8 Danksagung	103

1 Zusammenfassung

Das allergische Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion. Klinisch findet sich ein Symptomenkomplex aus Engegefühl über der Brust, Husten und Giemen. Die bestehende Atemwegsentszündung verursacht eine Atemwegshyperreagibilität auf verschiedene Stimuli. Zudem findet im fortgeschrittenen Krankheitsstadium ein morphologischer Umbauprozess der Atemwege statt, das so genannte „*airway remodelling*“.

Nach symptomlosem Erstkontakt mit einem Allergen kann eine systemische Sensibilisierung des Organismus erfolgen. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen wird dieses von spezifischen, in der Sensibilisierungsphase gebildeten Immunglobulin-E-Molekülen (IgE) erkannt und gebunden. Durch Mastzelldegranulation kommt es zu einer akuten Atemwegsentszündung mit den typischen klinischen Symptomen eines akuten Asthmaanfalls. Die chronische Atemwegsentszündung ist insbesondere gekennzeichnet durch das *airway remodelling* und die Atemwegsreagibilität.

Ein zentraler Mechanismus in der allergischen Immunantwort ist die Interaktion des Allergens mit dem IgE. Die Spezifität des Antikörpers wird durch die klassische Antigenbindungsstelle bestimmt, in deren Zentrum sich die CDR-H3-Region (*complementarity determining region* der schweren Immunglobulinkette) befindet. Aus Vorarbeiten im murinen Modell der akuten Atemwegsentszündung ist bekannt, dass eine qualitativ veränderte CDR-H3-Region einen entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung des allergischen Phänotyps nimmt. Es gibt jedoch auch Studien, die eine Interaktion von Antigenen als sogenannte Superantigene postulieren. Diese Superantigene interagieren mit den wenig variablen *framework*-Regionen der Antikörper und stellen somit potente Induktoren einer Immunantwort dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der CDR-H3-Region in einem murinen Modell der chronischen allergischen Atemwegsentzündung zu charakterisieren. Dazu wurden neben den Wildtyptieren (wt-Tiere) eine transgene Mauslinien mit qualitativ veränderter CDR-H3-Region untersucht. Δ D-id- Tiere besitzen eine CDR-H3-Region mit vorwiegend geladenen Aminosäuren. Die Versuchstiere wurden systemisch auf das Allergen Ovalbumin sensibilisiert. Durch aerosolische Allergen-Provokation wurde eine lokale allergische Entzündungsreaktion induziert. Als Kontrollen dienten nicht-sensibilisierte Mäuse des entsprechenden Genotyps. Es wurden die vier fundamentalen Aspekte des Asthma-Phänotyps charakterisiert: (i) die allergische Sensibilisierung, (ii) die allergische Atemwegsentzündung, (iii) die Atemwegsreagibilität und (iv) der irreversible Atemwegsumbau.

Während sich in sensibilisierten Δ D-id-Tieren signifikant geringere Immunglobulin-Serumspiegel fanden als bei sensibilisierten wt-Tieren ließen sich bezüglich der eosinophilen Atemwegsentzündung und dem *airway remodelling* keine signifikanten Unterschiede zwischen Δ D-id- und wt-Tieren nachweisen.

Interessante und vom akuten Modell abweichende Ergebnisse wurden bei der Atemwegsreagibilität gefunden. Sensibilisierte wt-Tiere zeigten eine deutlich erhöhte Atemwegsreagibilität auf den inhalativen Stimulus Methacholin im Vergleich zu nicht-sensibilisierten Tieren. Sensibilisierte Δ D-id-Tiere hingegen zeigten gegenüber den nicht-sensibilisierten Δ D-id-Tieren keine erhöhte Atemwegsreagibilität. Trotz systemischer Sensibilisierung und inhalativer Provokation mit OVA konnte in Δ D-id-Tieren keine Atemwegshyperreagibilität (AHR) induziert werden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine qualitativ veränderte CDR-H3-Region einen entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung der chronisch allergischen Atemwegsentzündung nimmt. Die allergische Sensibilisierung, gemessen an den Serum-IgE-Spiegeln, lässt sich durch die qualitativ veränderte CDR-H3-Region signifikant vermindern. Die AHR ist vollständig aufgehoben.

2 Einleitung

2.1 Das allergische Asthma bronchiale

2.1.1 Definition und Hinführung

Asthma wird heute definiert als eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, charakterisiert durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion (Bousquet et al. 2008; Virchow 2005). Klinisch findet sich ein Symptomenkomplex aus Engegefühl über der Brust, Husten und Giemen (Reed 2006). Die Symptome sind häufig vergesellschaftet mit einer reversiblen Atemwegsobstruktion, die entweder spontan oder nach Medikamentenapplikation abklingt. Die bestehende Atemwegsentzündung verursacht eine Atemwegshyperreagibilität auf verschiedene Stimuli (Bousquet et al. 1999). Zudem findet im fortgeschrittenen Krankheitsstadium ein Umbauprozess der Atemwege statt, das so genannte „*airway remodelling*“ (Bousquet et al. 2008; Elias et al. 1999).

Epidemiologisch spielt das Asthma bronchiale eine wichtige Rolle. Es ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Erwachsenenalter, im Kindesalter stellt es sogar die häufigste chronische Erkrankung dar. Etwa 10 % aller Kinder sind davon betroffen (Akinbami und Schoendorf 2002). Analog zu anderen allergischen Erkrankungen steigt die Inzidenz der Erkrankung sowohl in den westlichen Industrienationen als auch in Entwicklungsländern (Akdis 2006; Bousquet et al. 2004; Bach 2002; American Thoracic Society 2000).

Die komplexe Pathogenese des Asthmas ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird ein Zusammenspiel zwischen genetischen und verschiedenen Umwelteinflüssen diskutiert (Cookson und Moffatt 2004; Los et al. 1999). Genetisch spielt die Bereitschaft, gegen an sich harmlose Umweltantigene, mit einer Immunantwort und Produktion des Immunglobulins E (IgE) zu reagieren, eine wichtige Rolle (Los et al. 1999).

Im Folgenden werden die zum Verständnis dieser Arbeit wichtigen Aspekte der Pathogenese des Asthma bronchiale dargestellt.

2.1.2 Systemische Sensibilisierung

Die systemische Sensibilisierung findet nach dem symptomlosen Erstkontakt mit dem Allergen statt. Coombs und Gell (1963) definierten vier Typen von Überempfindlichkeitsreaktionen. Die Sofortreaktion beim Asthma bronchiale ist eine Immunantwort vom Typ I. Sie ist IgE-vermittelt und tritt Minuten bis Sekunden nach Allergenkontakt auf. Darüber hinaus spielt für die Spätreaktion beim Asthma eine Typ IV Reaktion eine wichtige Rolle. Diese ist Zell-vermittelt und tritt Stunden nach Allergenkontakt auf (Janeway et al. 2005).

Im Falle des Asthma bronchiale wird das Allergen (z.B. Pollen oder Milbenantigene) inhaliert und gelangt in die Luftwege. Durch die vorhandene enzymatische Aktivität kann das Allergen die *tight junctions* des Atemwegepithels durchbrechen (Kauffman et al. 2000). Subepithelial trifft es auf dendritische Zellen und Makrophagen (Holt 2000). Diese antigen-präsentierenden Zellen nehmen das potenzielle Allergen auf, wandern in regionale Lymphknoten und präsentieren es dort als kleine Peptidfragmente in Verbindung mit dem MHC II-Komplex auf ihrer Oberfläche (MHC = *major histocompatibility complex II*) (Maddox und Schwartz 2002; Noah und Becker 2000). Diese Peptidfragmente können in Verbindung mit bestimmten anderen Oberflächenmarkern von B- und T-Zellen erkannt werden, falls diese den entsprechend spezifischen Rezeptor exprimieren. Wurde das Antigen durch einen spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt, bindet die T-Zelle den MHC-Antigen-Komplex, wodurch sie aktiviert wird (Romagnani 2004).

Den so aktivierten T-Helferzellen (T_H) kommt durch Freisetzung bestimmter Muster an Zytokinen eine entscheidende Rolle im weiteren Verlauf der Immunantwort zu (Walker et al. 1994). Man unterteilte die T_H -Zellen lange Zeit in nur zwei Untergruppen (Abbas et al. 1996). Nach neueren Erkenntnissen entwickeln sich aus ein und derselben Vorläuferzelle jedoch mehr als nur zwei Untergruppen von T_H -Zellen (Tab. 1). Sie unterscheiden sich in Ihrer Funktion, dem Zytokinprofil und wirken zum Teil antagonistisch (Schmidt-Weber et al. 2007).

T_H1 -Zellen zeichnen sich durch die Ausschüttung von Interleukin 2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) aus, was zu einer

IgG_{2a}-getriggerten Immunantwort führt. Eine IgE-Immunantwort wird durch IL-2 und IFN- γ durch direkte Effekte auf B-Zellen unterdrückt (Coffman und Carty 1986; Pene et al. 1988).

T_H2-Zellen hingegen produzieren vor allem die Interleukine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 (Busse et al. 2001). Diese triggern eine IgE- und IgG₄- (homolog zum murinen IgG₁) dominierte Immunantwort. Aktivierte T_H-Zellen stimulieren durch ihre sezernierten Zytokine B-Zellen zur Ausreifung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Im Falle der T_H2-geführten Immunantwort führen vor allem IL-4 und IL-5 zu einem Isotypenwechsel hin zu den Immunglobulinen der Klassen E und G₄ (Bacharier und Geha 2000; Romagnani 2004). Im Mausmodell ist die allergische Immunantwort geprägt durch erhöhte Produktion von IgE und IgG₁ (Kim et al. 2007).

Der T_H17-Zelltyp produziert vor allem IL-17 und IL-22, die proinflammatorisch wirken und an Autoimmunprozessen beteiligt sind. IL-17 und IL-22 können die Freisetzung von TNF- α , IL-6 und anderen Chemokinen induzieren. Diese wiederum scheinen neutrophile Granulozyten zu mobilisieren, die somit zu einer akuten Entzündung beitragen (Hellings et al. 2003). Andererseits können T_H17-Zellen die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und die Atemwegshyperreagibilität reduzieren (Schnyder-Candrian et al. 2006).

Einen vierten T_H-Zelltyp stellen die T_{reg}-Zellen dar. Durch ihre sezernierten Zytokine, vor allem IL-10 und TGF- β können sie die Aktivität anderer T-Zellen hemmen. Atemwegseosinophilie, AHR und Mukushypersekretion sollen so unterdrückt werden können (Larché 2007).

Tab. 1 Die verschiedenen T_H-Zelltypen

T-Zelltyp	Muster der sezernierten Interleukine	Durch Interleukine aktivierte Zellen	Folgen
T_H1	IFN- γ , IL-2, TNF- α	Dendritische Zellen, Keratinozyten, Epithelzellen	Epithelabschilferung, Apoptosis
T_H2	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13	Eosinophile, Mastzellen, Myofibroblasten	Atemwegs-hyperreagibilität, <i>airway remodelling</i>
T_H17	IL-17, IL-22	Neutrophile, Fibroblasten, Keratinozyten	akute Entzündung, <i>remodelling</i>
T_{reg}	IL-10, TGF- β	T _H 1, T _H 2, T _H 17, Dendritische Zellen	Hemmung der anderen T _H -Zelltypen, Reparatur-mechanismen

Eine weitere Klasse von Lymphozyten scheint für die Entwicklung des Asthma bronchiale von Bedeutung zu sein: *invariant natural killer T-cells* (iNKT-Zelle), die Eigenschaften von T_C- und T_H-Zellen in einer Zelle vereinen. Sie erkennen Antigene, die in Verbindung mit MHC I-Molekülen präsentiert werden. Binden Antigene am spezifischen T-Zell-Rezeptor wird die iNKT-Zelle aktiviert. Dies führt zur Produktion von T_H2-Zytokinen wie IL-4 und IL-13. So kann Atemwegshyperreagibilität, Entzündung und IgE-Produktion in Mäusen, unabhängig von T_H2-Zellen, induziert werden (Pham-Ti et al. 2006; Akbari et al. 2003).

Die als Allergene wirkenden Umweltantigene führen zu einem Ungleichgewicht zwischen T_H1- und T_H2- getriggelter Immunantwort mit einem Überwiegen der T_H2-Aktivierung. Dies führt zur oben genannten Zytokinfreisetzung, IgE-Produktion und letztendlich zur Entwicklung klinischer Symptome einer Allergie (Akdis 2006).

Wieso es zu dieser Polarisierung zugunsten der T_H2-Immunantwort kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Erklärungsansätze gehen von einem

Zusammenspiel zwischen genetischen Faktoren, Umweltfaktoren sowie den Eigenschaften des Antigens aus (Bousquet et al. 2004; Thomas et al. 1998). Zu den Eigenschaften eines potentiellen Allergens können eine enzymatische Aktivität, Proteincharakter und niederes Molekulargewicht gehören. Außerdem eine gute Löslichkeit, Stabilität, das Vorkommen in niedrigen Dosen und die Fähigkeit an MHC II Moleküle des Wirts zu binden (Kauffman et al. 2000, Akdis 2006).

Im Rahmen der Umweltfaktoren wird die Hygienehypothese diskutiert. Sie versucht zu erklären, warum in den westlichen Industrienationen die Prävalenz von Allergien drastisch angestiegen ist (Wills-Karp et al. 2001). Der menschliche Organismus ist in den frühen Lebensjahren, auf Grund hoher hygienischer Standards, einer geringeren Exposition bakterieller und parasitärer Infektionen ausgesetzt als noch vor wenigen Jahrzehnten. Es wird vermutet, dass es dadurch zu einer T_H1 - T_H2 -Imbalance kommen kann, die zu Asthma bronchiale und anderen atopischen Erkrankungen führen kann (Bach 2006). Ein weiterer Aspekt der Umwelteinflüsse sind frühkindliche Infektionen mit RS-Viren (*respiratory syncytial virus*), was ein Risikofaktor für die spätere Entwicklung eines Asthma sein kann (Dakhama et al. 2005). Außerdem stellt die Exposition gegenüber Hausstaubmilben, Katzen-, Hundehaaren und anderen potenziellen Allergenen einen weiteren Risikofaktor gegenüber der Entwicklung eines allergischen Asthma bronchiale dar (Soto-Quiros et al. 2002).

2.1.3 Pathophysiologie der allergischen Atemwegsentzündung

2.1.3.1 Die allergische Frühphasereaktion

Die während der Sensibilisierungsphase gebildeten spezifischen Antikörper zirkulieren im Blut um anschließend an hochaffine IgE-Rezeptoren ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}$), vor allem auf Mastzellen und auf basophilen Granulozyten, zu binden (Busse und Lemanske 2001).

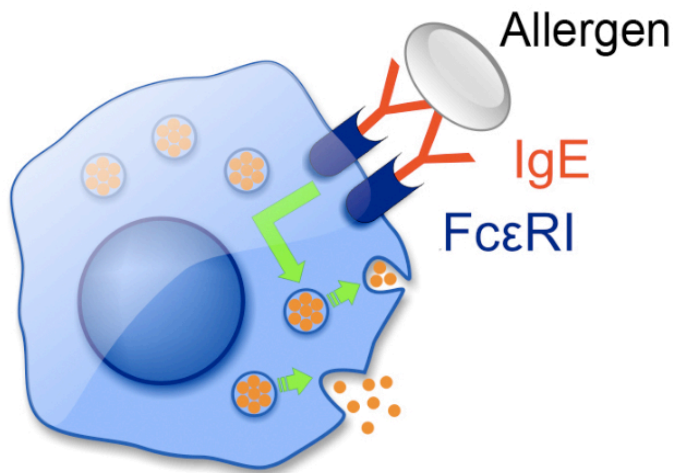


Abb. 1 Die Mastzelle

Durch Kreuzvernetzung von IgE-Rezeptoren ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}$) erfolgt die Exozytose von Mediatoren wie Histamin und Serotonin.

Quelle: Eigenanfertigung durch T. Ohletz

© T. Ohletz, 2008

Mastzellen spielen in der allergischen Frühphasereaktion eine bedeutende Rolle (Reuter und Taube 2008, Venkatesha et al. 2005). Sie entwickeln sich als mononukleäre Zellen im Knochenmark um anschließend in Mukosa und Submukosa der Atemwege und andere Schleimhäute des Körpers, wie den Gastrointestinaltrakt, einzuwandern. Sie tragen auf der Oberfläche Rezeptoren für den F_C -Teil von IgE, den so genannten hochaffinen $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor. Durch Kreuzvernetzung zweier $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -Rezeptoren kommt es zur Freisetzung präformierter Mediatoren aus der Mastzelle (Reuter und Taube 2008, Lane und Lee 1997). Zu diesen proinflammatorisch wirkenden Mediatoren gehören Histamin, Serotonin und verschiedene Enzyme, die unter anderem die Bildung von Arachidonsäurederivaten (Leukotrienen) katalysieren (Williams und Galli 2000). Die Hauptwirkung dieser Mediatoren besteht in der Entwicklung einer Atemwegsentzündung. Durch Extravasation, Gefäßdilataion und Bronchospasmus kommt es zur akuten Verlegung der Atemwege, durch Chemotaxis wird ein weiteres Einwandern von Entzündungszellen induziert. Zusammenfassend wird dies als allergische Sofortreaktion (Fireman 2003,

Bousquet et al. 2000) mit charakteristischen klinischen Symptomen bezeichnet (Maddox und Schwartz 2002).

Das IgE spielt dabei in der allergischen Frühphasereaktion eine sehr bedeutende Rolle. Es stellt die Schnittstelle zwischen Allergen und Immunsystem dar und ist somit direkt an der Immunreaktion beteiligt. Da das IgE am FcεRI-Rezeptor der Mastzelle gebunden ist, kann man es auch als „Mastzellrezeptor“ bezeichnen (Kinet 1999), welcher der Mastzelle erst die Spezifität verleiht (Kerzel et al. 2009). Es erkennt das Umweltantigen und induziert eine Immunantwort, die Mastzelle ist so die erste Effektorzelle (Robinson 2004).

2.1.3.2 Die Spätreaktion der IgE-vermittelten allergischen Entzündung

Die späte Phase der allergischen Reaktion ist zeitlich etwa sechs bis neun Stunden nach Allergen-Provokation einzuordnen. Sie ist nicht mehr nur durch Reaktionen auf Mastzell-Mediatoren geprägt, sondern vielmehr findet nun eine Rekrutierung und Aktivierung anderer Zelltypen statt: eosinophile Granulozyten, T-Zellen, basophile Granulozyten und Makrophagen (Busse und Lemanske 2001, Bousquet et al. 2000). T_H2-Zellen stellen durch ihr Zytokinprofil einen der Schlüsselmechanismen für diese Spätreaktion dar. Vor allem IL-4 und IL-5 induzieren Reifung und Einwanderung von eosinophilen Entzündungszellen, was ein wichtiges Charakteristikum der Atemwegsentzündung darstellt (Maddox und Schwartz 2002, Busse und Lemanske 2001).

Neuere Studien befassen sich mit der Quelle des primär gebildeten IL-4, dem „initial-IL-4“, welches für die Rekrutierung der ersten Entzündungszellen in die Lunge verantwortlich ist. Nach Min und Paul sind dafür basophile Granulozyten verantwortlich (Min und Paul 2008). Angkasekwinai et al. postulieren eine wichtige Funktion des IL-25, einem Vertreter der IL-17-Familie. In der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung potenziert das IL-25 die Expression von Transkriptionsfaktoren (c1, JunB) in T-Zellen, was zu einer verstärkten Produktion des „initial-IL-4“ führt. IL-25 wird von Lungenepithelzellen im Rahmen einer Immunantwort gebildet (Angkasekwinai et al. 2007).

Die eosinophilen Granulozyten übernehmen eine wichtige Effektorfunktion in der Erhaltung der chronischen Atemwegsentzündung (Maddox und Schwartz 2002). Sie besitzen intrazelluläre Granula mit Proteinen, die die Atemwegsentzündung unterhalten und fördern. Zu diesen Proteinen zählt unter anderem das *Major basic protein*, das direkt Atemwegsepithel schädigt und eine Degranulation von Basophilen und Mastzellen bewirken kann. Außerdem befinden sich in den eosinophilen Granula verschiedene Leukotriene. Diese können eine Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur auslösen (insbesondere Leukotrien C₄) und die Gefäßpermeabilität erhöhen und damit Schleimhautödeme fördern oder weitere Eosinophile in die Atemwege rekrutieren (Busse und Lemanske 2001, Rothenberg 1998).

Klinisch äußert sich die Spätreaktion der allergischen Entzündung in einer Obstruktion der Atemwege. Im Gegensatz zur Frühphasereaktion ist diese aber nicht mehr allein durch die Entzündungskomponente bedingt, sondern wird durch mehrere Mechanismen verursacht. Hierzu zählen eine gesteigerte Mukusproduktion, Schleimhautödem, weiteres Einwandern von Entzündungszellen und Bronchospasmus (Virchow 2005).

2.1.4 Atemwegshyperreagibilität

Ein charakteristischer Aspekt des fortgeschrittenen Krankheitsverlaufs des Asthma bronchiale ist die Überempfindlichkeit der Atemwege auf unspezifische (= allergen-unabhängige) Reize (Schoor et al. 2000), was als Atemwegshyperreagibilität (AHR) bezeichnet wird (Cockcroft und Davis 2006). Die AHR kann durch direkte pharmakologische (Methacholin, Histamin) und indirekte physikalische (kalte Luft, Zigarettenrauch, körperliche Anstrengung) Stimuli ausgelöst werden (Cockcroft und Davis 2006).

Physikalische Stimuli wirken unspezifisch auf die hyperreagiblen Atemwege. Die pharmakologischen Stimuli dagegen wirken über substanzabhängige Rezeptoren. Im Vergleich zu Gesunden kommt es beim Asthmatiker bereits bei sehr geringen Dosen dieser pharmakologisch wirksamen Substanzen zum Einsetzen einer Bronchokonstriktion (Virchow 2005). Dies kann man sich im Rahmen eines inhalativen Provokationstestes zu Nutzen machen. Ist eine

Obstruktion der Atemwege nicht nachweisbar, besteht aber dennoch klinisch der Verdacht auf eine obstruktive Ventilationsstörung mit hyperreagiblem Bronchialsystem kann eine inhalative Provokation mit oben genannten Substanzen durchgeführt werden. Patienten mit hyperreagiblen Atemwegen reagieren bereits auf geringe Konzentrationen dieser Substanzen mit einer Atemwegsobstruktion.

Die persistierende AHR scheint das Ergebnis einer Kombination mehrerer Mechanismen zu sein: erhöhte Kontraktilität der glatten Bronchialmuskulatur, Wandverdickung der Luftwege und verkleinerter Atemwegsquerschnitt durch Ödeme und entzündliches Infiltrat (Schoor et al. 2000). Des Weiteren werden neuronale Mechanismen diskutiert, wie eine Stimulation des cholinergen erregenden oder Inhibition des noradrenergen Systems (Hargreave et al. 1986). Mastzellen spielen als Effektor- und Mediatorzellen in der Entstehung und Unterhaltung der AHR eine wichtige Rolle (Begueret et al. 2007, Amin et al. 2005). Daneben beeinflusst auch das Bronchialepithel die AHR (Qin et al. 2007).

2.1.5 Irreversibler Atemwegsumbau (*Airway Remodelling*)

Eine akute Entzündung führt zu Verletzungen im Gewebe, die normalerweise vollständig repariert werden können, damit das Gewebe weiterhin funktionsfähig bleibt (*restitutio ad integrum*). Im Gegensatz dazu ist das Asthma bronchiale eine chronisch entzündliche Erkrankung. Diese persistierende Entzündung führt langfristig zu irreversiblen Umbauprozessen, die die Funktionsfähigkeit der Atemwege einschränkt. Diesen Prozess nennt man *airway remodelling* (Maddox und Schwartz 2002).

Zunächst wird, ebenso wie bei einer akuten Verletzung, ein Heilungsprozess induziert. Dieser teilt sich in zwei Anteile: Zum einen wandern parenchymatöse Zellen ein und ersetzen das verletzte Gewebe durch Zellen des gleichen Typs. Zum anderen wandern Fibroblasten ein, die zu Narbengewebe reifen können. Dieser Heilungsprozess kann entweder zur vollständigen Rückbildung von

Atemwegsstruktur und Funktion führen oder aber zu Atemwegsfibrose und einer Zunahme an glatter Muskulatur (Sumi und Hamid 2007, Elias et al. 1999). Das *airway remodelling* beim Asthma bronchiale ist geprägt durch eine Verdickung der Alveolarwand, sowie eine Zunahme an glatter Bronchialmuskulatur und Becherzellen (Davies et al. 2003). Beim Gesunden sind Becherzellen nur in den knorpeligen Atemwegen zu finden. In der asthmatisch veränderten Lunge hingegen finden sich Becherzellen auch in den peripheren Bronchiolen (Elias et al. 1999). Sie zeichnen sich durch eine erhöhte Mukusproduktion aus. Dadurch erhöht sich die Viskosität des Bronchialsekrets und die mukuziliäre Clearance nimmt ab (Tagaya und Tamaok 2007, Pavia et al. 1985). Zusätzlich setzt die erhöhte Menge an Bronchialsekret die Oberflächenspannung der Atemwege herab, wodurch diese leicht kollabieren (Bousquet et al. 2000).

Diese histologischen Veränderungen und Mechanismen führen zu einem erhöhten Atemwegswiderstand, der durch entzündliche Infiltrate und Ödeme noch verstärkt wird (Tagaya und Tamaok 2007, Bousquet et al. 2000, Busse et al. 1999).

Die Hypertrophie der glatten Bronchialmuskulatur lässt sich beim Menschen vor allem in den proximalen großen Atemwegen nachweisen, die distalen Atemwege hingegen sind nur selten betroffen (Busse et al. 1999). Getriggert wird die Zunahme der glatten Muskulatur durch Entzündungsmediatoren, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Diese Mediatoren werden unter anderem von Mastzellen freigesetzt, die durch wechselseitige Beeinflussung im engen Kontakt mit der glatten Bronchialmuskulatur stehen (Tagaya und Tamaok 2007). Durch Mediatoren wie IL-4, IL-13 und Tryptase können sie die glatte Bronchialmuskulatur zur Proliferation anregen. Die Muskulatur wiederum unterhält durch eigene Mediatoren (CCL11, CCL5 (RANTES), CCL2 (*monocyte chemoattractant protein 1*), IL-6, CXCL8, IL-8, IL-1) die Mastzellaktivierung und –rekrutierung (Robinson 2004).

Die einzelnen pathophysiologischen Ereignisse, die zum *airway remodelling* führen sind noch nicht komplett verstanden. Einen entscheidenden Anteil scheinen Fibroblasten und eosinophile Granulozyten zu spielen (Bush 2008),

die verschiedene zytotoxisch wirkende Zytokine (*tissue-growth-factor*, Matrix-metalloproteinase-9) produzieren (Maddox und Schwartz 2002).

Des Weiteren wird die so genannte „work hypertrophy“ diskutiert, die als Produkt der sich wiederholenden Bronchospasmen gesehen wird (Bousquet et al. 2000). Die Basalmembran des Alveolarepithels besteht aus der Basallamina und der Lamina reticularis. Letztere ist durch Ablagerungen von Immunglobulinen und/oder Kollagen I und III und Fibronectin verdickt, während die Basallamina unverändert bleibt (Tagaya und Tamaok 2007). Durch diese Veränderung der subepithelialen Fibrose versucht das Immunsystem, die chronische Entzündung einzudämmen (Maddox und Schwartz 2002, Chetta et al. 1997).

Zusammengenommen können die oben genannten Aspekte des *airway remodelling* (Basalmembranverdickung, erhöhte Mukusproduktion) als Bestreben des Immunsystems gesehen werden, die Allergenexposition des Kompartiments Lunge zu minimieren. Neben dieser physikalischen Barriere versucht das Immunsystem durch erhöhte Zellapoptose des Bronchialepithels (Trautmann et al. 2005), vermehrte allergenspezifische IgA-Produktion der Mukosa (Böttcher et al. 2002) und vermehrte T_{reg}-Aktivität die asthmatische Entzündung zu regulieren. Zusammenfassend lässt sich dieser Effekt als „*wash-away-effect*“ bezeichnen (Akdis 2006).

2.2 Entstehung der Antikörpervielfalt

Antikörpermoleküle sind heterodimere Proteine, bestehend aus zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten. Die Ketten bestehen wiederum aus einer konstanten (C) und einer variablen (V) Domäne. Die C-Region definiert die Effektor- bzw. Signalfunktion, die V-Region die Antigenspezifität.

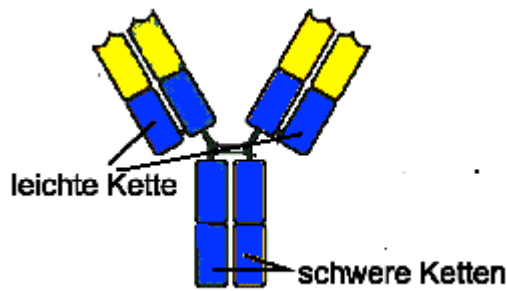


Abb. 2 Das Antikörpermolekül

gelb: variable Domäne

blau: konstante Domäne

(Modifiziert. nach Janeway et al. 2005)

Das Antikörperrepertoire des Menschen umfasst bis zu 10^{11} verschiedene Antikörpermoleküle, die in so genannten Gensegmenten kodiert sind. Aus diesen Segmenten entsteht, nach im Folgenden beschriebenen Mechanismen, das große Spektrum der Antikörperspezifität (Janeway et al. 2005).

Die Gene der variablen Region der leichten Kette bestehen aus zwei Segmenten: Ein V_L -Gen-Segment und J_L -Gen-Segment („V“ steht für *variable*, „J“ steht für *joining* und stellt das Verbindungsstück zur konstanten Region C_L dar). Die Gene der schweren Kette bestehen aus drei Gensegmenten: ein V_H -Gen-Segment, ein D-Gen-Segment (*diversity*) und ein J_H -Gen-Segment. Diese Gensegmente liegen in multiplen Kopien im menschlichen Genom vor. Auf Chromosom 22 im so genannten λ -Locus und auf Chromosom 2 im κ -Locus liegen die V_L - und J_L -Gensegmente, wobei V_L in insgesamt 70 Kopien vorliegt, J_L in neun funktionellen Segmenten (Tonegawa et al. 1983). Für die Gensegmente der schweren Kette existiert nur ein Locus auf Chromosom 10 mit 65 funktionellen V_H -Gen-Segmenten, 27 D_H -Segmenten und sechs J_H -Segmenten (Thiebe et al. 1999). Zur Übersicht der somatischen Rekombination dient Abb 3.

Theoretisch könnte jede einzelne B-Zelle jede mögliche schwere Kette zusammen mit jeder möglichen leichten Kette kombinieren. So könnten theoretisch $3,5 \times 10^6$ verschiedene Antikörperspezifitäten entstehen (Janeway et al. 2005). In Wirklichkeit ist diese Zahl aber geringer, da nicht jede V_H - mit jeder V_L -Region kombiniert werden kann, da ansonsten ein instabiles Immunglobulinmolekül entsteht (Fanning et al. 1996).

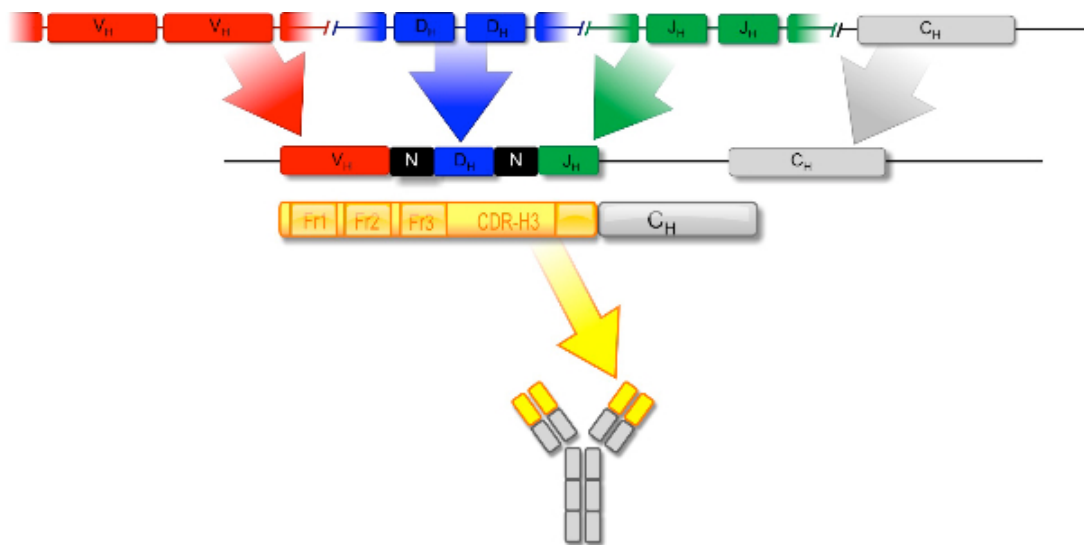


Abb. 3 Entstehung der Antikörpervielfalt durch somatische Rekombination

In der somatischen Rekombination werden V_H-, D_H- und J_H-Gensegmente miteinander kombiniert.

Fr: framework region

Quelle: Eigenanfertigung durch T. Ohletz © T. Ohletz, 2008

Die funktionale Vielfalt entsteht durch zufälliges Einfügen von N-Nukleotiden (*non template Nukleotide*) an den Verknüpfungsstellen zwischen V-, D- und J-Gensegmenten. Dieser Prozess wird durch RAG-Proteinkomplexe, DNA-Ligasen, terminale Desoxynucleotidyltransferasen (Tdt) und weitere Enzyme katalysiert (Janeway et al. 2005, Gauss und Lieber 1996).

Während alle bisher beschriebenen Mechanismen bei der Umordnung der Gensegmente angreifen, findet die somatische Hypermutation in der reifen B-Zelle statt. Sie tritt auf, wenn reife B-Zellen nach Aktivierung durch T-Zellen auf ein Antigen reagieren. In den variablen Regionen der schweren und leichten Ketten finden Punktmutationen statt. Die durch solche Punktmutationen veränderten Antikörper werden anschließend auf der Oberfläche als B-Zell-Rezeptor präsentiert. Durch einige dieser Punktmutationen können manche der Antikörper besser an Antigene binden als andere. Da eine einzelne B-Zelle nur Antikörper genau einer Spezifität exprimiert, werden die B-Zellen mit der höchsten Antikörperaffinität selektiert und reifen zu antikörper-sezernierenden Zellen aus (Noia und Neuberger 2007). Diese so genannte Affinitätsreifung findet vor allem in den *hot spots* Bereichen statt. Sie befinden sich in der

variablen Region und sind kurze Bereiche mit einer Länge von vier bis fünf Basenpaaren (Beth et al. 1993, Janeway et al. 2005).

2.3 Allergen-Antikörper-Interaktion

Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist eine reversible, nichtkovalente Interaktion, die durch hohe Salzkonzentrationen, extreme pH-Werte oder durch Konkurrenz an der Bindungsstelle gelöst werden kann. An der Bindung wirken elektrostatische Kräfte, hydrogene Bindungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Kräfte (Braden et al. 1998). Das IgE Molekül weist zusätzlich eine Besonderheit in der Tertiärstruktur auf, in der es sich von den anderen Immunglobulinklassen unterscheidet (Wan et al. 2002). Es besitzt eine gebogene, Taschenmesser-ähnliche Konformation, die „zuschnappt“, sobald das Molekül an seinen hoch affinen FcεRI Rezeptor bindet. Dadurch entsteht die hohe Bindungskraft, die andere Rezeptor-Liganden-Interaktionen weit überbietet (Wilson und Stanfield 1994).

An der Antigen-Bindung des Antikörpermoleküls sind leichte und schwere Kette des Antikörpers beteiligt. Beide besitzen variable Regionen, die sich wiederum in jeweils drei hypervariable Regionen aufteilen und die von weniger variablen Abschnitten flankiert werden (Davies und Chacko 1993). Die hypervariablen Regionen nennt man HV1, HV2 und HV3 oder CDR1, CDR2 und CDR3 („complementarity determining regions“). Die sie flankierenden, weniger variablen Regionen sind die „framework regions“, FR1 bis FR4 (Wilson und Stanfield 1994).

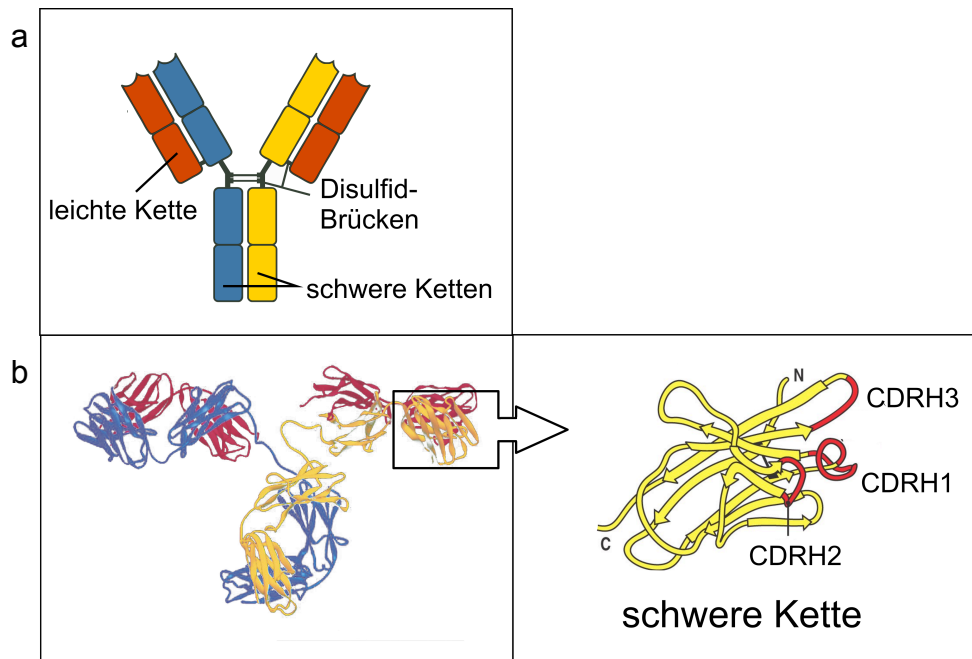


Abb. 4 Das Antikörpermolekül

In Bild a ist eine schematische Zeichnung des Antikörpermoleküls zu sehen. Bild b zeigt ein Bandendiagramm eines Antikörpers, basierend auf einer kristallographischen Durchleuchtung. Daraus vergrößert ist die Antigenbindungsstelle der schweren Kette mit den CDR-Regionen.

(Modifiziert nach Janeway et al. 2005)

Gemeinsam bilden die sechs CDR-Regionen der leichten und schweren Kette die klassische Antigenbindungsstelle (Decanniere et al. 2000). Sie erkennen einen spezifischen Anteil des Antigens. Dieser Teil des Antigens wird als Epitop oder „*antigenic determinant*“ bezeichnet (Wilson und Stanfield 1994). Die restlichen Anteile der variablen Region spielen bei der Antigenbindung eine untergeordnete Rolle (Laffer et al. 2001). Sie stellen vielmehr einen strukturellen Rahmen für die hypervariablen Schleifen dar und helfen die Bindung zum Antigen festzulegen (Edwards et al. 2002).

CDR-1 und CDR-2 werden ausnahmslos von den V-Segmenten kodiert und bilden die Außenseite der Antigenbindungsstelle. Das CDR-3-Intervall hingegen ist ein Produkt des V(D)J-*joining* und zeichnet sich damit durch eine besonders große Vielfalt aus (Xu und Davis 2000). Es liegt außerdem im

Zentrum der Antigenbindungsstelle (Schroeder et al. 1998, Decanniere et al. 2000, Laffer et al. 2001) und spielt damit eine entscheidende Rolle in der Antigenerkennung und –bindung (Collis et al. 2003). Neben der Variabilität in der Zusammensetzung der CDR-H3-Region nimmt auch ihre Länge Einfluss auf die Antigenspezifität (Barrios et al. 2004). Die CDR-H3-Region stellt das Zentrum der Antigenbindungsstelle dar und ist somit ein entscheidendes Bindeglied zwischen Antigen und Immunsystem.

Es gibt jedoch auch bestimmte Antigene, die so genannten Superantigene, die in der Lage sind, mit den *framework regions* zu interagieren. Dadurch könnten sie eine viel größere Anzahl an Immunglobulin-Molekülen binden, da sich die FR-Regionen durch eine sehr viel kleinere Variabilität in ihrer Zusammensetzung auszeichnen als die hochspezifisch variablen CDR-H-Regionen (Marone et al. 2006). So sind diese Superantigene sehr potente Induktoren einer Immunantwort und sollen in Autoimmunerkrankungen, Immundefekterkrankungen und Allergien eine Rolle spielen (Marone et al. 2007). Zum einen konnte gezeigt werden, dass die allergische Sensibilisierung charakterisiert ist durch eine affinitäts-getriggerte Produktion spezifischer IgE-Moleküle unter dem Einfluss eines T_H2-Zytokin-Milieus (Gould et al. 2006). Im Gegensatz hierzu steht die Beobachtung, dass bei Patienten mit Allergien, Asthma bronchiale oder atopischer Dermatitis bestimmte V_H-Familien des IgE bevorzugt genutzt wurden (Dommiati-Saad et al. 1996, Marone et al. 2007, Bouvet und Marone 2007). Diese Beobachtung führte zur Hypothese der Superallergene. Der Begriff „Superallergen“ wurde als neuer immunologischer Mechanismus zur Aktivierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten geprägt (Marone et al. 2006).

2.4 Die Rolle der CDR-H3 Region im allergischen Asthma

An der zentralen Stelle der Antigenbindung befindet sich die CDR-H3-Region, die signifikante Auswirkung auf die Antigenspezifität und –affinität hat (Xu und Davis 2000). Sie weist eine besonders große Variabilität in ihrer Zusammensetzung auf (Benedict et al. 2000).

Aus Vorarbeiten zum akuten Asthmodell ist bekannt, dass qualitativ modifizierte CDR-H3-Regionen eine Veränderung im allergischen Phänotyp nach sich ziehen (Kerzel et al. 2009). Transgene Mauslinien, die eine CDR-H3-Region mit vorwiegend geladenen Aminosäuren besitzen, zeigen eine verminderte Ausprägung des allergischen Phänotyps. Diese Tiere hatten deutlich reduzierte Spiegel an Gesamt- und an allergen-spezifischem IgE. Darüber hinaus war bei diesen Mäusen die eosinophile Atemwegsentzündung signifikant reduziert. Dies spiegelte sich auch im lokalen Zytokinmilieu wider, welches deutlich reduzierte Spiegel von IL-4, IL-5 und IL-13 in der bronchoalveolären Lavage (BAL) zeigte. Die funktionelle Bedeutung der CDR-H3-Region als Zentrum der Antigenbindungsstelle konnte so gezeigt werden. Hingegen fanden sich in der Lungenfunktion der Mäuse keine Unterschiede zwischen der transgenen Mauslinie und den Wildtyp-Tieren.

2.5 Das Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung

Durch Sensibilisierung mit dem Modellallergen Ovalbumin (OVA) und nachfolgender Aerosolprovokation kann in Mäusen eine allergische Atemwegsentzündung mit Influx von Eosinophilen in die Atemwege und lokalem T_H2 -Zytokinmilieu, eine IgE-Immunantwort, eine Atemwegshyperreagibilität und das *airway remodelling* induziert werden (Renz et al. 1992, Herz et al. 1997, Hamelmann et al. 1999).

Bezüglich einiger Mediatoren und Immunglobulin-Subklassen (das humane IgG₄ entspricht dem murinen IgG₁) bestehen strukturelle Unterschiede zu den

humanen Äquivalenten. Dennoch lassen sich grundlegende funktionelle Mechanismen des Immunsystems auf das humane Immunsystem übertragen. Neben der Untersuchung des allergischen Phänotyps legt das „chronische Modell der allergischen Atemwegsentzündung“ ein besonderes Augenmerk auf den Aspekt des *airway remodellings*. Methodisch zeichnet sich das „chronische Modell“ durch eine deutlich verlängerte aerosolische Allergenprovokation als das „akute Modell“ aus.

Es konnte gezeigt werden, dass sich nach verlängerter Allergenprovokation, die für das menschliche Asthma typischen morphologischen und physiologischen Veränderungen der Lunge auch im Tiermodell nachweisen lassen (McMillan und Lloyd 2004, Wegmann et al. 2005). Die Basalmembranverdickung mit vermehrter Kollagenablagerung resultiert aus einer Zunahme an Extrazellulärmatrix. Von Myofibroblasten produzierte Kollagene I, III und V und andere Matrixproteine, wie Tenascin und Laminin, werden an der Alveolarwand abgelagert (McMillan und Lloyd 2004). Von dieser Dickenzunahme der Alveolarwand sind proximale und distale Atemwege betroffen (Wegmann et al. 2005). Eine Zunahme an glatter Bronchialmuskulatur und eine progressive Zunahme an mukusproduzierenden Zellen konnten durch Allergeninhalation induziert werden. Während die Becherzellhyperplasie und die damit einhergehende Zunahme der Mukusproduktion, im akuten Asthmodell auf die proximalen Atemwege beschränkt ist, kann im chronischen Asthmodell eine solche Becherzellhyperplasie auch in den distalen Atemwegen nachgewiesen werden (Wegmann et al. 2005). Dieser Aspekt kann im chronischen Modell der allergischen Atemwegsentzündung sehr viel besser berücksichtigt werden als im akuten Modell und kommt daher der Situation im Menschen daher näher.

Das Mausmodell ist eine geeignete Möglichkeit, um eine chronische allergische Atemwegsentzündung nachzustellen. Die wesentlichen immunologischen Mechanismen ähneln denen des Menschen.

2.6 Fragestellung

Aus Vorarbeiten zum „akuten Modell“ ist die Bedeutung der CDR-H3-Region für die Ausprägung des allergischen Phänotyps bereits bekannt (Kerzel et al. 2009). Im „chronischen Modell“ soll nun dem Aspekt des *airway remodelling* und der AHR weiter nachgegangen werden.

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass die CDR-H3-Region bei chronischer Allergenexposition einen entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung des allergischen Phänotyps besitzt und die chronisch allergische Atemwegsentzündung, die systemische Sensibilisierung, die Lungenfunktion und das *airway remodelling* beeinflusst. In einem murinen Modell der chronischen allergischen Atemwegsentzündung soll daher die Rolle der CDR-H3-Region genauer charakterisiert werden.

Um die Arbeitshypothese zu überprüfen, soll konkret folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

1. Lässt sich eine Sensibilisierung gegen OVA auch noch nach zwölf Wochen nachweisen?

- Sind die Immunglobulin-Spiegel mit denen des akuten Modells vergleichbar?
- Unterscheiden sich die transgenen Tiere untereinander oder im Vergleich zur wt-Kontrolle bezüglich der Immunglobulin-Spiegel?

2. Welche Bedeutung hat die CDR-H3-Region für die lokale allergische Entzündungsreaktion in der Lunge im „chronischen Modell“?

- Lassen sich zwischen den transgenen Tieren und den wt-Tieren Unterschiede in der Eosinophilenzahl in der BAL zeigen?
- Können Unterschiede in den Zytokinspiegeln in der BAL zwischen den transgenen Tieren und den wt-Tieren gezeigt werden?
- Bestehen in der Eosinophilenzahl und den Zytokinspiegeln Unterschiede zum „akuten Modell“?

3. Hat die CDR-H3-Region eine Bedeutung auf die Lungenfunktion im Rahmen der chronischen allergischen Atemwegsentzündung?

- Unterscheidet sich die Methacholin-Response zwischen den transgenen Mäusen und den wt-Tieren?
- Bestehen in der Lungenfunktion Unterschiede zum „akuten Modell“?

4. Findet ein *airway remodelling* statt?

- Unterscheiden sich die transgenen Tiere untereinander oder von den wt-Tieren in der Becherzellhyperplasie oder im Muzinvolumen?

3 Material und Methoden

3.1 Mausmodell des allergischen Asthma bronchiale

3.1.1 Tierhaltung und Tierzucht

Die Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen mit einem Hell-/ Dunkelrhythmus von 12/12 Stunden gehalten. Maximal befanden sich sechs Tiere des gleichen Geschlechts, nach Genotypen getrennt, in einem Käfig. Sie wurden mit Ovalbumin-freiem Futter und Wasser *ad libitum* versorgt. Als Kontrolltiere dienten Wildtyp-Tiere (wt), die von Harlan Winkelmann (Borchen, D) erworben wurden. Die Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen nach Tierversuchsordnung durch das Regierungspräsidium Gießen lag vor.

3.1.2 Transgene Tiere mit qualitativ veränderter CDR-H3

Die Genotypen Δ D-iD und Δ D-DFL besitzen eine qualitativ veränderte CDR-H3-Region. Sie unterscheiden sich in der Antigenbindungsstelle durch ihre Hydrophobizität. Diese transgenen Mauslinien wurden in der Arbeitsgruppe von H.W. Schroeder Jr. in Birmingham (Alabama, USA) hergestellt.

Die Δ D-iD Maus

In der Δ D-iD-Maus wurde der DH-Lokus entfernt und durch eine invertierte Sequenz von DSP2.2 ersetzt (Ippolito et al. 2006). Dieser Austausch führt zu einer bevorzugten Verwendung der geladenen Aminosäuren Arginin, Histidin und Asparagin (Ippolito et al. 2006). Deshalb generieren die Δ D-iD-Mäuse B-Zell-Rezeptoren, deren CDR-H3-Region mit positiv geladenen Aminosäuren angereichert ist. Δ D-iD-Mäuse besitzen also einen verschobenen Ausschnitt des in wt-Tieren vorhandenen Repertoires an CDR-H3-Regionen. In der CDR-H3-Region von wt-Tieren beträgt der Anteil an geladenen Aminosäuren weniger als 5% (Ivanov et al. 2005). Die Zucht vor Ort erfolgte durch Verpaarung homozygoter Δ D-iD-Mäuse untereinander.

Die Δ D-DFL Maus

Diese Tiere besitzen ebenfalls nur einen einzigen D_H -Locus. Dieser D_H -Locus, das DFL 16.1 Gen-Segment, kodiert bevorzugt für die neutralen Aminosäuren Tyrosin und Glycin. Damit ist das Antikörperrepertoire der Δ D-DFL Tiere in seiner Vielfalt zwar stark eingeschränkt, entspricht in der bevorzugten Hydrophobizität der CDR-H3-Regionen aber weitgehend dem der wt-Tiere (Schelonka et al. 2005). Die Zucht vor Ort erfolgte durch Verpaarung homozygoter Δ D-DFL-Mäuse untereinander.

3.1.3 Gewinnung genetischen Materials

Zur Sicherstellung der Homozygotie der Versuchs- und Zuchttiere wurde jedes Tier genotypisiert. Zur Gewinnung des genetischen Materials wurde den Mäusen ein etwa 3 mm langes Stück des Schwanzes mit einer desinfizierten Präparationsschere abgetrennt. Dieses Gewebe wurde bis zur weiteren molekularbiologischen Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.1.4 Genotypisierung

Material:

Gewebestück (Mäuseschwanz)

Lysis Puffer	Qiagen; Hilden, D
Proteinase 7.5 AU	Qiagen; Hilden, D
Isopropanol	Merck; Darmstadt, D
70% Ethanol	Merck; Darmstadt, D
DNA-Extraktionskit (QiAmp DNA Mini Kit)	Qiagen; Hilden, D
Primer	MWG-Biotech; Ebersberg, D
Agarose	Biozym GmbH; Hess. Oldendorf, D
TBE-Puffer	Sigma; Deisenhofen, D
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics; Mannheim, D
Orange Loading Dye Solution	Fermentas; Burlington, Canada

DNA-Ladder (10511-012)	Invitrogen; Karlsruhe, D
TE-Puffer	Sigma; Deisenhofen, D
Geräte:	
Thermoblock Biometra Trio	Biometra; Göttingen, D
Kühlzentrifuge	Hermle; Wehingen, D
Eppendorfgefäße	Eppendorf; Wesseling, D
Thermoblock Biometra Trio	Biometra; Göttingen, D
Thermocycler GeneAmp	
PCR System 9600	Perkin Elmer; Wellesley, USA
Kühlzentrifuge	Hermle; Wehingen, D
Fotoeinheit	MWG-Biotech; Ebersberg, D
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat; Marne-la-Vallée, F
Infinity Capt (PC-Programm)	Vilber Lourmat; Marne-la-Vallée, F
Gelkammer mit Spannungsquelle	Pharmacia, Erlangen, D

Durchführung:

Aus der entnommenen Gewebeprobe (3.1.3) wurde die DNA gemäß Herstellervorschrift mittels eines DNA-Extraktionskits isoliert. Der Nachweis homozygoter Allele erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Dabei wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Tab. 2 Reaktionsansatz der PCR zur Genotypisierung

Reagenz	Menge [µl]
dest. Wasser	12,4
dNTPs 10 mM	0,5
Quiagen 10x Puffer	2,5
Q Solution 5x	5,0
MgCl ₂ 25 mM	2,0
Primer 1 (10pmol/µl)	0,5
Primer 2 (10pmol/µl)	0,5
Primer 3 (10pmol/µl)	0,5
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1
Tail DNA	1,5
Summe:	25,0

Tab. 3 Primer für PCR

Allel	sense	antisense	Amplifikatlänge
ΔD	5'-CAA GCC TCT CTA CTT CCT CAT A-3'	5'-CCA ATG CTC TCT ACA CCT GC-3'	~ 300 bp
wt	5'-CAA GCC TCT CTA CTT CCT CAT A-3'	5'-CAA GTG AAT GAC AGA TGG-3'	~ 310 bp

In der PCR findet ein Screening auf das ΔD -Allel statt. Die Genotypen ΔD -id und ΔD -DFL lassen sich untereinander nicht unterscheiden. Eine Differenzierung ist nur zwischen den transgenen Mauslinien und der wt-Kontrollgruppe möglich.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler GeneAmp nach folgendem Schema:

Tab. 4 PCR Cycler-Schema

PCR Cycler-Schema für die transgenen Mauslinien ΔD -id und ΔD -FL, sowie die wt-Genotypisierung.

Schritt	Temperatur	Zeit
1.	94°C	2,5 min.
2.	94°C	1 min.
3.	59°C	1 min.
4.	72°C	1 min.
5.	Schritte 1 bis 4 werden 30 mal wiederholt	
6.	72°C	10 min.
7.	4°C	Bis zur Weiterverarbeitung

Die mittels PCR gewonnenen Amplifikate wurden durch Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

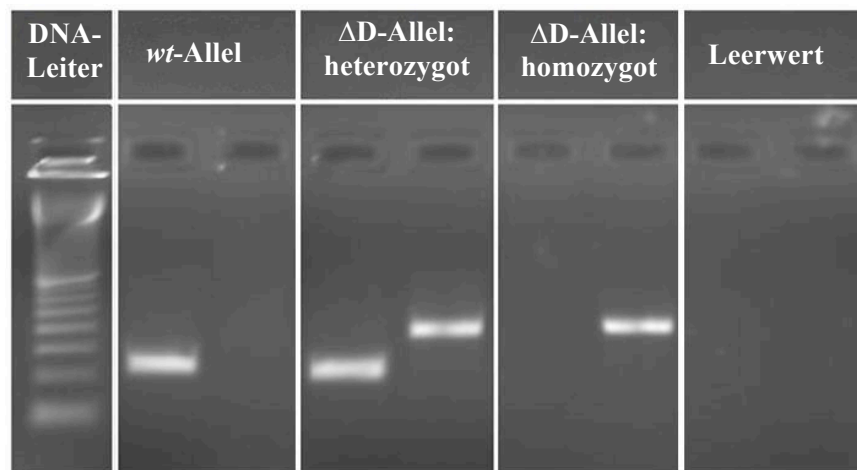


Abb. 5 Gelelektrophorese

Bei Homozygotie Nachweis einer Bande derselben Amplifikatlänge (wt 300bp, Δ D-iD 310bp). Bei Heterozygotie Nachweis von Amplifikaten beider Längen.

3.1.5 Allergische Sensibilisierung und Induktion der Atemwegsentzündung

Material:

Ovalbumin VI (Sigma A-2512)	Sigma; Deisenhofen, D
Aluminiumhydroxid Imject Alum (ALU)	Pierce; Rockford (IL), USA
Sterile gepufferte Kochsalzlösung	Seromed Biochrom; Heidelberg, D
Dulbeccos` s PBS (Phosphat Buffered Saline)	PAA; Linz, A
Ovalbumin, Grad V	Sigma; Deisenhofen, D

Geräte:

1 ml Spritzen	BD; Heidelberg, D
s.c. Kanülen	BD; Heidelberg, D
Aerosolgenerator PariBoy	Pari-Werke; Starnberg, D
Expositionskammer aus Plexiglas	Eigenanfertigung

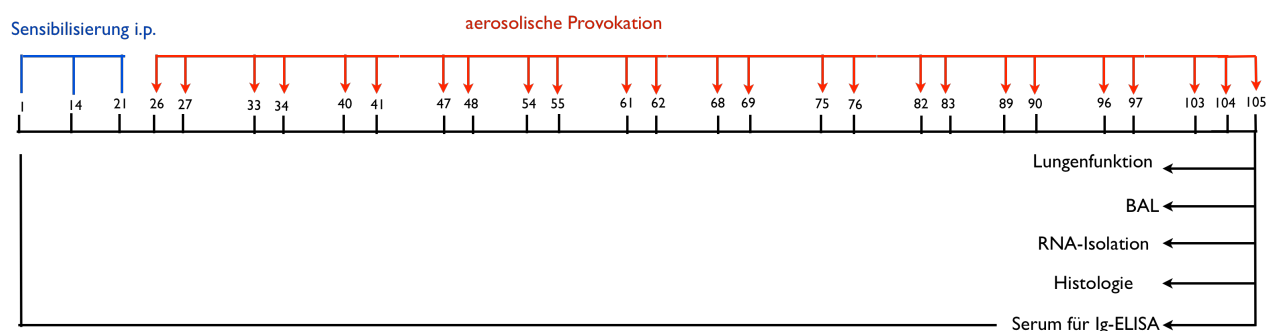
Durchführung:

Die Tiere wurden gemäß dem etablierten murinen Allergiemodell (Wegmann et al. 2005) auf das Modellallergen Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Hierzu erhielten die Tiere an den Tagen 1, 14 und 21 eine intraperitoneale Immunisierungslösung mit 10 µg OVA und 1,5mg ALU. Darauffolgend wurden die Tiere an insgesamt 24 Tagen einer aerosolischen OVA-Provokation ausgesetzt. Am Tag 105 des Versuchsprotokolls fand die Datengewinnung statt (Sensibilisierungsprotokoll Abb. 6). Zur Übersicht der Tiergruppen dient Tab. 5.

Tab. 5 Tiergruppen

OVA: Ovalbumin; ALU: Aluminiumhydroxid

Genotyp	Sensibilisierung (i.p.)	Aerosolische Provokation
wt (Balb/c)	ALU + OVA VI	OVA V
	PBS	PBS
Δ D-DFL	ALU + OVA VI	OVA V
	PBS	PBS
Δ D-iD	ALU + OVA VI	OVA V
	PBS	PBS

**Abb. 6 Sensibilisierungsprotokoll**

i.p.: intraperitoneal; BAL: Bronchoalveoläre Lavage; ELISA: Enzyme linked Immuno Assay

Zur aerosolischen Provokation wurden die Tiere für 20 min. einem Aerosol von 1% OVA Grad V in steriler PBS ausgesetzt.



Abb. 7 Versuchsaufbau der inhalativen Provokation

Links sind die Tiere in der Expositions-kammer zu sehen. Rechts steht der PariBoy zur Verneblung des Aerosols.

3.2 Serumgewinnung

Zur Quantifizierung der Immunglobuline im Serum wurde den Tieren vor der ersten Sensibilisierung und nach der letzten inhalativen Provokation Blut entnommen.

Um die Blutentnahme zu erleichtern, wurden die Tiere für ca. 5 Minuten in der Wärmekammer bei 50°C erwärmt. Anschließend wurde ihnen im Blutentnahme-Block (Abb 8) die untere Schwanzvene mit dem desinfizierten Skalpell eingeschnitten und das Blut (ca. 200 µl) in einem Eppendorfgefäß aufgefangen.

Nach dem Gerinnen wurde das Vollblut bei 4000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und bei -20°C bis zu den ELISA-Messungen eingefroren.



Abb. 8 Blutentnahme bei der Maus

Die Maus sitzt während der Blutentnahme in einem speziell angefertigten Blutentnahme-Block aus Plexiglas.

3.3 ELISA

Material:

Ovalbumin VI	Sigma; Deisenhofen, D
Dulbecco's PBS	PAA; Linz, A
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck; Darmstadt, D
Schwefelsäure (H_2SO_4 2N)	Merck; Darmstadt, D
Tween 20	Merck; Darmstadt, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma; Deisenhofen, D
Streptavidinperoxidase	Calbiochem; Bad Soden, D
POD-Substrat BM blue	Roche; Mannheim, D
Immunglobulin- Standards für murines	
IgE, IgG ₁ , IgG _{2a} , IgM, IL-5	BD; Heidelberg, D
1° Antikörper: gegen murines	
IgE, IgG ₁ , IgG _{2a} , IgM, IL-5	BD; Heidelberg, D
Biotinylierte 2° Antikörper gegen	
murines IgE, IgG ₁ , IgG _{2a} , IgM, IL-5	BD; Heidelberg, D
Maus Anti-Ovalbumin (Standard)	Serotec; Düsseldorf, D

Geräte:

96-well-Rundbodenplatten	Nunc; Roskilde, DK
Rüttler	Bühler; Hechingen, D
ELISA-Platten-Waschautomat	ASYS Hitech GmbH; Eugendorf, A
ELISA-Platten-Lesegerät	ASYS Hitech GmbH; Eugendorf, A
Reader - Software	Mikrotek; Overath, D

Durchführung:

Die Messung der Immunglobulin-Spiegel im Serum und des IL-5 in der BAL erfolgte mittels Sandwich-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

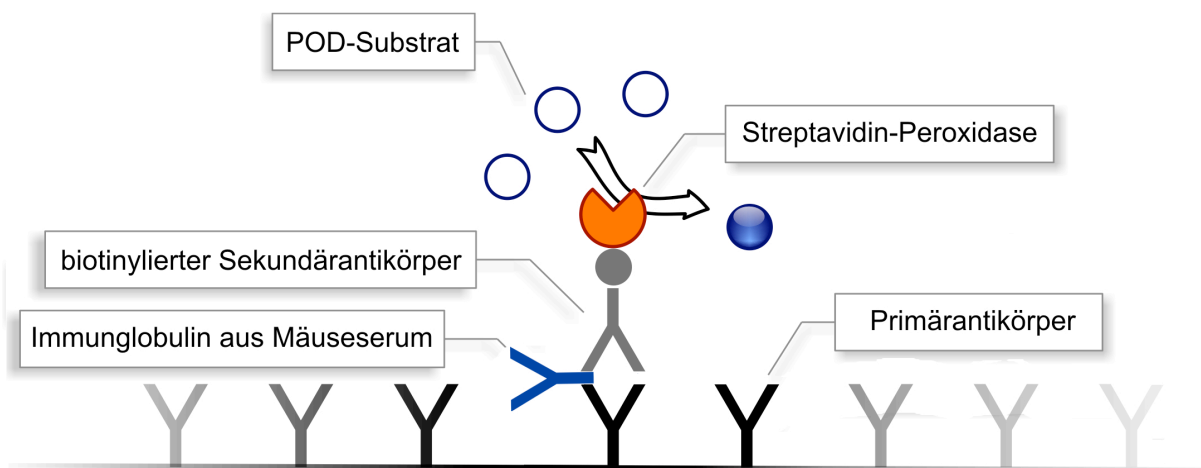


Abb. 9 Prinzip des Sandwich – ELISA

Quelle: Eigenanfertigung durch T. Ohletz;
© T. Ohletz. 2008

Zuerst wurden die 96-well-Rundbodenplatten mit 100µl/Vertiefung mit dem Primärantikörper beschichtet (in der Abbildung schwarz dargestellt). Die gecoatete Platte inkubierte bei +4°C über Nacht (Konzentrationen in Tab.). Nach dreimaligem Waschen mit dem Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween) wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungen 3% BSA in PBS im Überschuss (150 µl/Vertiefung) hinzupipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT erfolgten drei weitere Waschgänge. Anschließend wurden die zu messenden Serumproben sowie die Standards (100µl/Vertiefung, Abb.) aufgetragen. Hierauf folgte eine erneute Inkubation bei +4°C über Nacht. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte die Markierung mit den biotinylierten 2°Antikörpern mit 100 µl/Vertiefung. Auf einen erneuten Waschvorgang folgte die Zugabe des Enzyms Streptavidin-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:10.000 mit der Verdünnungslösung (100 µl/ Vertiefung). Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach besonders gründlichem Waschen (8x) wurden 100 µl/Vertiefung des Peroxidase-Substrates hinzupipettiert. Die Entwicklung erfolgte bei RT für 10 min im Dunkeln und wurde anschließend durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt.

Die Messung der Absorption erfolgte direkt im Anschluss mit dem ELISA-Platten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 570 nm.

Mithilfe der mitgeführten Standardkurve wurden computergestützt die Konzentrationen der Serumproben berechnet.

Tab. 6 Konzentration der Reagenzien für die Immunglobulin-ELISAs

Analyt	Beschichten mit	1° Antikörper bzw. Allergen	Verdünnung der Proben	2° Antikörper	Standardreihe (1:2 Verdünnungsreihe)
Gesamt IgE	Anti IgE	2 µg/ml	1:500	4 µg/ml	100 ng/ml
Gesamt IgG₁	Anti IgG ₁	2 µg /ml	1:100.000	5 µg/ml	250 ng/ml
Gesamt IgG_{2a}	Anti IgG _{2a}	4 µg/ml	1:10.000	4 µg/ml	500 ng/ml
Gesamt IgM	Anti IgM	4 µg/ml	1:10.000	5 µg/ml	500 ng/ml
OVA spezifisches IgE	Allergen OVA	20 µg/ml	01:20	5 µg/ml	100 ng/ml
IL-5	Anti IL-5	1 µg/ml	01:01	2 µg/ml	4 ng/ml

3.4 Bronchoalveoläre Lavage

3.4.1 Durchführung der Bronchoalveolären Lavage

Material:

PBS	PAA; Linz, A
1% BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma; Deisenhofen, D
Proteinase-Inhibitor Complete	Roche; Mannheim, D
Alkoholische Desinfektionslösung	Braun; Melsungen, D

Geräte:

Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf; Wesslingen, D
1 ml Spritze	BD; Heidelberg, D
Kanülen (0,45x13mm)(Microlance3)	BD; Heidelberg, D

Durchführung:

Zur Quantifizierung der Atemwegsentzündung wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Hierzu wurden nach dem Töten der Tiere durch zervikale Dislokation Lunge und Trachea vorsichtig freipräpariert. Die Trachea wurde kranial durch eine kleine Arterienklemme abgeklemmt. Kaudal davon wurde eine um 70° gebogene Kanüle unter Sichtkontrolle in die Trachea eingeführt. Durch diese wurden 800 µl sterile PBS mit Proteinase-Inhibitor (1 Tablette/50 ml) in die Luftwege injiziert und reaspiert. Nach Abnahme eines Aliquots zur Zellzählung und zur Herstellung der Zytospin-Präparate wurde die BAL-Flüssigkeit bei 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren.

3.4.2 Zytozentrifugation (Zytospin) und morphologische Klassifizierung

Material:

Diff-Quick™	Baxter Dade; Duedingen, CH
PBS	PAA; Linz, A
Casyton Verdünnungslösung	Schärfe System; Reutlingen, D
Objektträger mit BAL	

Geräte:

Objektträger	Menzel; Braunschweig, D
Zytozentrifuge	Shandon, Pittsburgh, (PA), USA
Lichtmikroskop	OPTech GmbH; München, D
Casy Cell Counter	Schärfe System; Reutlingen, D
Analyse System	Schärfe System; Reutlingen, D
Casycup	Schärfe System; Reutlingen, D
Lichtmikroskop	OPTech GmbH; München, D
Assistant Counter	Karl Hecht KG; Sondheim, D

Durchführung:

50 µl der BAL-Flüssigkeit wurden mit 150 µl PBS vermischt und durch Zentrifugation bei 700 U/min für 5 min auf Objektträger übertragen. Nach

einstündigem Trocknen an der Luft erfolgte die Fixierung und HE-Färbung mit Diff-Quick. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Klassifizierung der Zellen bei 400facher Vergrößerung. Dabei wurden zweimal mindestens 100 Zellen beurteilt.

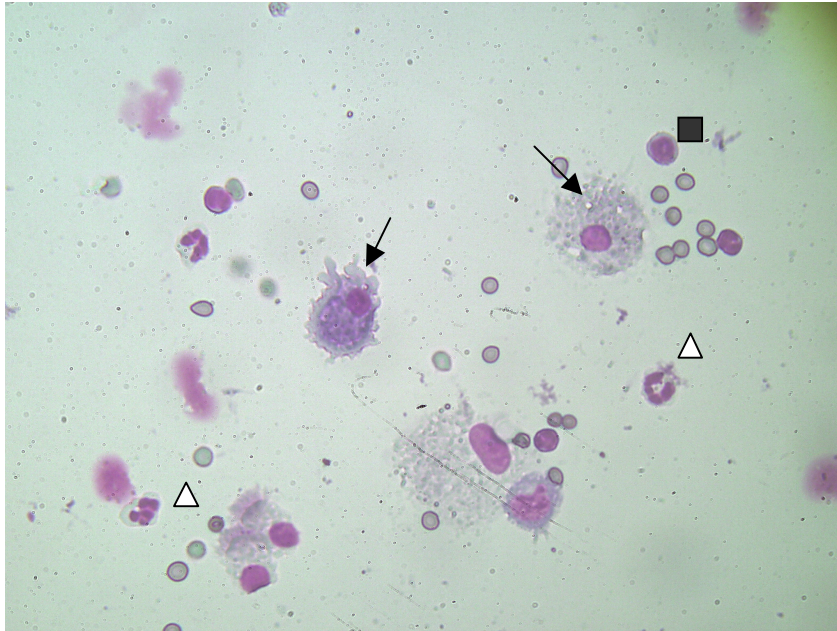


Abb. 10 Lichtmikroskopische Vergrößerung der BALF

Eosinophilen Granulozyten (Δ), Alveolarmakrophagen (\rightarrow) und neutrophilen Granulozyten(\blacksquare)

3.5 Messung der Atemwegsfunktion

3.5.1 Messprinzip Head-out Bodyplethysmographie

Die Lungenfunktion wurde am lebenden Tier mit einem Head-out Bodyplethysmograph durchgeführt. Dieses Messverfahren erlaubt die kontinuierliche Aufzeichnung und Beurteilung des Atemflusses an lebenden und spontan atmenden Tieren (Glaab et al. 2001).

Jedes Tier saß in einem eigenen Glaskolben. Der Kopf ragte aus diesem, durch eine Gummimannschette am Hals abgedichtet, heraus (Abb 11.). Vier dieser Glaskolben waren an eine größere Expositions-kammer angeschlossen,

so dass vier Tiere simultan untersucht werden konnten, wobei Erfassung und Analyse der Atemflusskurven für jedes Tier individuell erfolgten. Die große Expositions-kammer des Head-out Bodyplethysmograph wurde durch eine Pumpe permanent mit einem Fluss von 200 ml/min ventiliert.

Durch die Gummimannschette um den Hals der Tiere waren die einzelnen Glaskolben weitgehend druckdicht verschlossen. Während der Atmung der Tiere entstanden Druckschwankungen, die mit einem angeschlossenen kalibrierten Pneumotachygraphen erfasst wurden. Über einen Differenzialdruckwandler (8T-2, Gaeltec; Dunvegan, UK) und nach einer Verstärkung (Gould Universal Amplifier; Dietzenbach, D) wurde das analoge Signal durch einen Analog- nach Digital-Konverter (A/D-Konverter) (DAS-16, Keithly; Germering, D) digitalisiert.

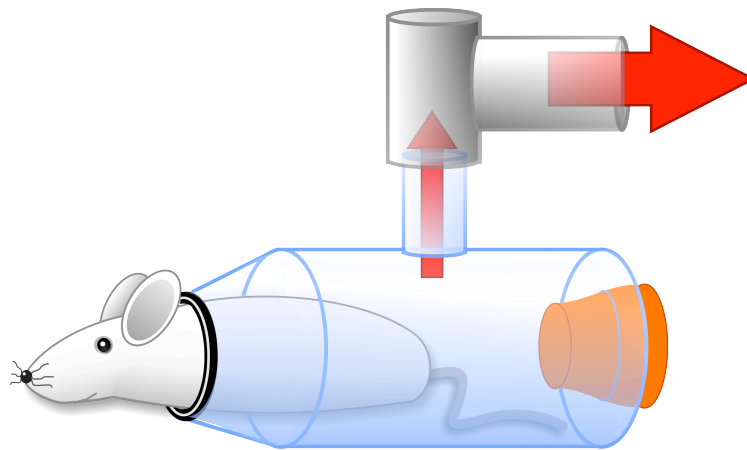


Abb. 11 Messprinzip der Bodyplethysmographie

Entlang der roten Pfeile findet die Verarbeitung der atemabhängigen Druckschwankungen statt. Diese Signale werden digitalisiert und von einem Computer erfasst.

Quelle: Eigenanfertigung durch T. Ohletz © T. Ohletz, 2008

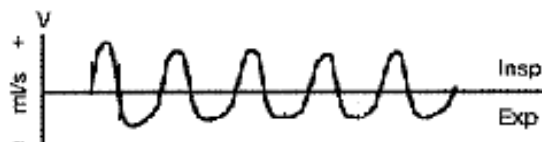
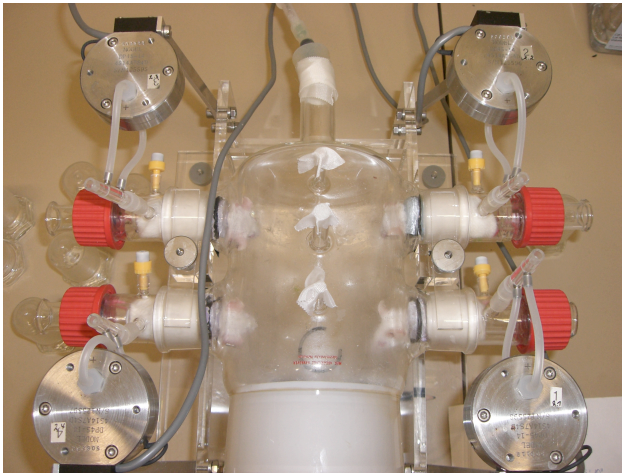


Abb. 12 Atemmuster

Normales Atemmuster mit atemabhängigen Druckschwankungen.

Modifiziert nach Glaab et al. 2001



**Abb. 13 Versuchsaufbau
Bodyplethysmographie (1)**

Vier mit Mäusen besetzte
Messplätze.

3.5.2 Methacholin-Provokation

Material:

Methacholin Sigma; Deisenhofen, D

(Acetyl- β -methyl-cholinchlorid)

PBS PAA; Linz, A

Geräte:

Aerosolgenerator PariBoy Pari-Werke; Starnberg, D

Durchführung:

Die permanente Ventilation der großen Expositions-kammer erlaubte die Applikation vernebelter Substanzen, in diesem Fall Methacholin in steigenden Dosen. Methacholin ist ein Agonist am Subtyp 3 des muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors (M_3 -Rezeptor). Er führt zu einer Konstriktion der glatten Bronchialmuskulatur und damit zu einer obstruktiven Ventilationsstörung (Gavett und Wills-Karp 1993). Die so messbare Methacholin-Response eignet sich als spezifischer Provokationstest zur Messung der Atemwegsreagibilität.

Nach Aufzeichnung einer 15-minütigen Baseline wurde zunächst nur das Vehikel PBS vernebelt, anschließend Methacholin, gelöst in PBS, in steigenden Konzentrationen für jeweils 70 sec, beginnend mit 6,25 mg/ml. (Tab.). Es folgte eine 3,5 minütige Wirkungsphase, danach erneute Methacholin-Verneblung.

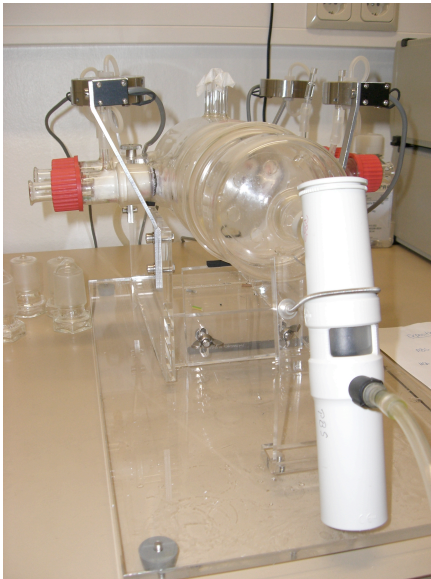


Abb. 14 Versuchaufbau Bodyplethysmographie (2)

Rechts im Bild ist ein Teil des PariBoys zur Aerosolapplikation zu sehen. Im Hintergrund sind die vier mit Mäusen besetzten Messplätze zu sehen, die mit einem roten Kolben verschlossen sind.

Zur Beurteilung der Bronchokonstriktion erfolgte die Bestimmung des expiratorischen Flusses (in ml/s) bei 50% der Vitalkapazität (*mid expiratory flow*, MEF₅₀). Dieser Parameter ist weitgehend unabhängig von der Mitarbeit und deswegen gut im Tiermodell verwertbar.

Tab. 7 Verneblungsprotokoll der Methacholin-Provokation

Zeit (min.)	Verneblung von
bis 15 min.	-
15:00 - 16:10	PBS
19:40 - 20:50	6,25 mg/ml MCh
24:20 - 25:30	12,5 mg/ml MCh
29:00 - 30:10	25 mg/ml MCh
33:40 - 34:50	50 mg/ml MCh
38:20 - 39:30	100 mg/ml MCh

3.6 Quantitative Histologie

Das menschliche chronische Asthma ist besonders gekennzeichnet durch einen kontinuierlich fortschreitenden Umbau der Atemwege, das *airway remodelling*. Um diesen wichtigen Aspekt auch im chronischen Tiermodell zu untersuchen, erfolgte eine quantitative Histologie. Um eine für das Gesamtorgan repräsentative Gewebeprobe zu gewinnen, wurde das stereologische Prinzip des *uniform systematic random sampling* angewandt.

Anhand dieser Gewebeproben wurden anschließend der Epithel- und der Becherzell-Anteil der Lungen bestimmt.

3.6.1 Stereologie

Die Stereologie ist die Lehre der räumlichen Interpretation von Schnitten. Sie befasst sich mit dem Verhältnis von Schnitten durch Körper zum Körper selbst. Es kommen Methoden der stochastischen Geometrie zum Einsatz.

Das Ziel in der Histologie ist es, eine dreidimensionale Gewebeprobe in eine zweidimensionale Form zu überführen, die repräsentativ für das gesamte Organ sind und sich somit verlässliche Aussagen über das gesamte Organ machen lassen. Dies kann durch geeignete Testsysteme erfolgen: im Fall der mikroskopischen Auswertung histologischer Schnitte sind das Punkt- und Liniengitter, die über das Gesichtsfeld gelegt werden. Sämtliche zu analysierenden Zielstrukturen, die das Gitternetz schneiden, gehen in die Auswertung ein. Somit ist diese Auswertung systematisch und randomisiert (Reed und Howard 1998).

Zur Beurteilung des „airway remodelling“ wurden das Muzinvolumen [Volumen/Oberfläche] mit einem Punktgitter und der Anteil an Becher- und Epithelzellen [%] mit einem Liniengitter als Parameter bestimmt.

Für jeden Parameter summierten sich in der Auswertung 100 Sichtfelder der Größe 500 x 500µm in 400facher Vergrößerung.

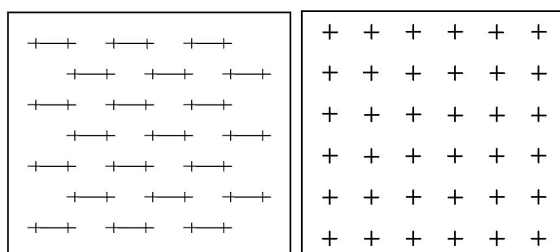


Abb. 15 Punkt- und Liniengitter

Diese Raster werden über das Gesichtsfeld gelegt. Sämtliche zu analysierende Zielstrukturen, die das Gitternetz schneiden, gehen in die Auswertung ein.

3.6.2 Vorbereitung der Lungen

Material:

Ampuwa	Braun; Melsungen, D
PBS	PAA: Linz, A
Neutral gepuffertes Formalin (10%)	Sigma; Deisenhofen, D

Durchführung:



Nach der BAL wurde die Injektionsstelle in der Trachea mithilfe des Präparationsbestecks erweitert und eine Trachealkanüle eingeführt. Diese wurde mit einem Faden fixiert. Nach vorsichtigem Freipräparieren wurde die Lunge mit 4% Paraformaldehyd (PFA) gefüllt (Abb 16). Das Fixans wurde mit konstantem Druck von 20 cm Wassersäule in die Lunge gedrückt. Nach 20 Minuten Instillation folgte die externe Fixation in 4% PFA über Nacht bei 4°C.

Abb. 16 Lungeninstillation

Bei konstantem Druck wird die Lunge mit 4% Paraformaldehyd befüllt.

3.6.3 Herstellung von histologischen Lungenschnitten

Material:

Agar-Agar-Granulat	Merck; Darmstadt, D
Paraffin	Vogel; Giessen, D
Paraformaldehyd (10%)	Merck; Darmstadt, D
Xylol	Merck; Darmstadt, D
Ethanol (100%, 96%, 70%)	Riedel De Haen; Seelze, D;
Perjodsäure	Merck; Darmstadt, D
Schiffsches Reagenz	Merck; Darmstadt, D
Hämalaun nach Mayer	Merck; Darmstadt, D

Methanol (10%)	Merck; Darmstadt, D
Entellan Schnelleindeckmittel	Merck; Darmstadt, D

Geräte:

Installationsgerät	Eigenanfertigung
Einbettungskassetten	Engelbrecht; Edermünde, D
Einbettungsautomat Tissue TEK VIP	Sakura Finetek BV; Zoeterwoude, N
Ausbettungsstation Tissue TEK	Sakura Finetek BV; Zoeterwoude, N
Schlittenmikrotom	Leica Instruments GmbH; Nussloch, D
Objektträger	Engelbrecht; Edermünde, D
Computer Assisted Stereology Toolbox	
CAST	Olympus; Albertslund, DK
Wiegekonstruktion nach Scherle	Eigenanfertigung

Durchführung:

Zur Volumenbestimmung und Anfertigung von Schnittbildern wurde die Trachea abpräpariert und die Lunge in einen rechten und einen linken Flügel aufgeteilt, wobei der rechte Lungenflügel aus vier Lappen besteht, der linke nur aus einem. Zur Volumetrie der Lungenflügel wurde die Methode der Flüssigkeitsverdrängung nach Scherle angewandt.

Die Lungen wurden für 90 Minuten in Agar-Agar eingebettet und anschließend mit Hilfe der Schneidekammer in 2 mm dicke Schreiben geschnitten. Diese lagerten in Paraffin bis sie mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms in 2 µm- Schnitte zerlegt wurden. Die 2 µm-Schnitte wurden auf Objektträger überführt. Sie mussten entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe dehydriert werden, um sie zur mikroskopischen Beurteilung nach PAS (periodic acid-Schiff) zu färben. Nach der PAS-Färbung erfolgte die Fixierung der Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und einer Eindeckung in Entellan. Die stereologische Analyse erfolgte computergestützt mit C.A.S.T.

Das Muzinvolumen pro Oberfläche [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$] wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{V}{S} = \frac{P_{(Muzin)} \times 0,5 \times L_{(P)}}{I_{(Epi)} \times I_{(Becher)}}$$

Der prozentuale Anteil an Becher- und Epithelzellen [%] wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{Epi}{Becher} = \frac{I_{(Epi/Becher)} \times 100}{I_{(Epi+Becher)}}$$

P: Punkte, die auf muzinhaltige Zellen treffen

$L_{(P)}$: Länge der Gitterpunkte

I: Intersections (Linien, welche die Basalmembran schneiden)

Epi: Epithelzellen

Becher: Becherzellen

3.7 Statistik

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe von Microsoft Excel und GraphPad Prism (Version 4). Die Ergebnisse der quantitativen Histologie wurden mit CAST (computer assisted stereology Toolbox) ausgewertet.

Die Ergebnisse der Punktwolken wurden als Median \pm Standardabweichung des Mittelwerts angegeben. Säulendiagramme bilden den Mittelwert \pm *standard error of the mean* ab.

Statistische Signifikanzen wurden für normalverteilte Messergebnisse mittels t –Test nach Student ermittelt. Für nicht normalverteilte Messergebnisse wurde der Mann-Whitney-Test (U-Test) angewandt. Der Kolmogorov-Smirnov-Test diente der Ermittlung von Normalverteilung. Für den t – und U-test wurden p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Sensibilisierung auf Ovalbumin

Um die Fähigkeit der systemischen Immunantwort der Mäuse zu evaluieren, wurden nach erfolgter intraperitonealer Sensibilisierung und aerosolischer Provokation die Immunglobulin-Spiegel im Serum bestimmt.

4.1.1 IgM-Spiegel

Die mit OVA sensibilisierten wt-Tiere zeigten nach intraperitonealer und inhalativer Provokation einen signifikanten Anstieg der Serum-IgM-Spiegel. Die IgM-Spiegel der Kontroll-Tiere hingegen änderten sich nach Sensibilisierung nicht (Abb 17).

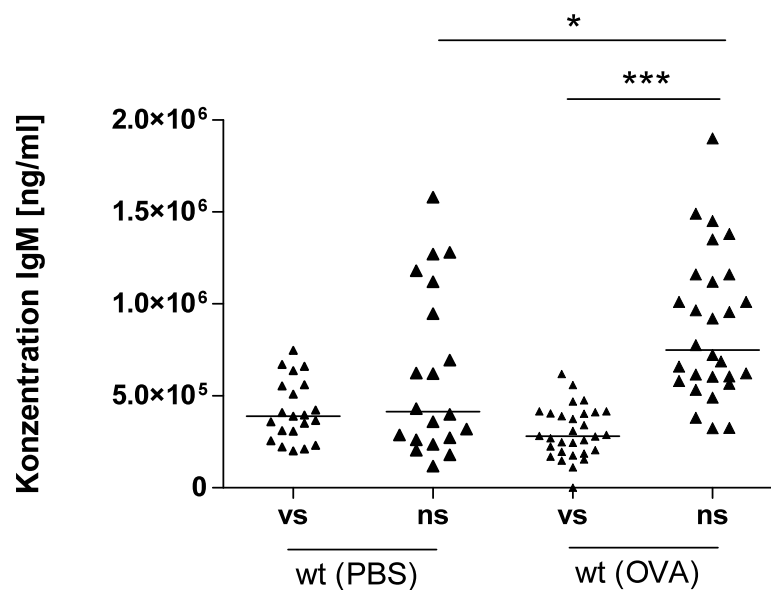


Abb. 17 IgM Serumspiegel in wt-Tieren

Die mit OVA sensibilisierten Mäuse (OVA) zeigten nach Sensibilisierung eine signifikante Zunahme des Serum-IgM-Spiegels. Bei den Kontrolltieren (PBS) blieben die IgM-Spiegel vor und nach Sensibilisierung gleich.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Im Gegensatz dazu stiegen die IgM- Spiegel bei den ΔD -id- Tieren nach Sensibilisierung mit OVA kaum an, wodurch es nach Sensibilisierung zu den deutlich niedrigeren IgM-Spiegeln im Vergleich zu den wt-Tieren kam ($p < 0,001$).

Bei den ΔD -DFL- Tieren liess sich im Vergleich zu den wt-Tieren nach Sensibilisierung kein signifikanter Unterschied in den IgM-Spiegeln nachweisen (Abb 18).

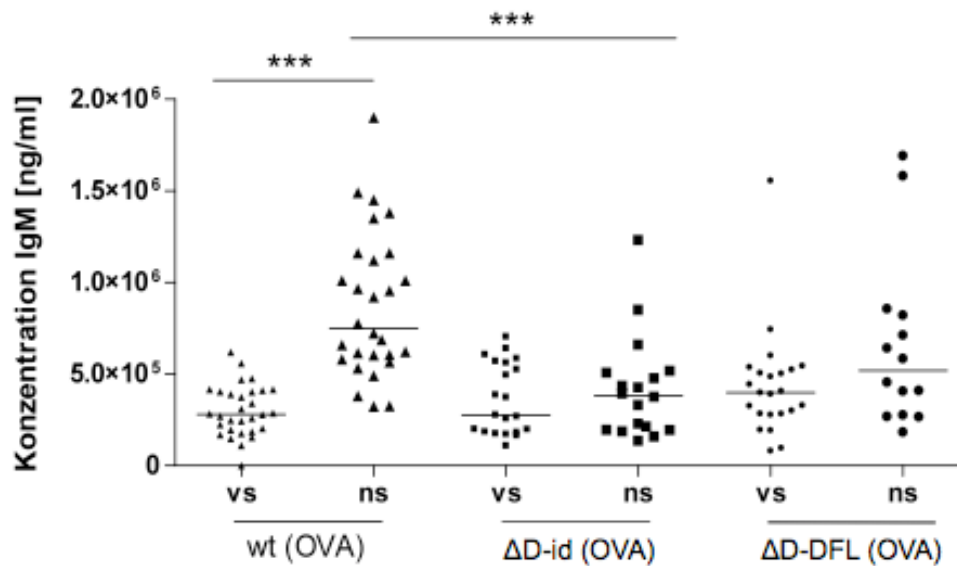


Abb. 18 IgM Serumspegel in ΔD -id- und ΔD -DFL-Tieren

Im Vergleich zu den wt-Tieren war der Anstieg des IgM-Serumspegels bei den ΔD -id-Tieren nach Sensibilisierung (mit OVA) signifikant vermindert. Kein Unterschied fand sich hingegen zwischen wt- und ΔD -DFL-Tieren.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

4.1.2 IgG₁-Spiegel

Die IgG₁-Spiegel der sensibilisierten wt-Tiere stiegen nach intraperitonealer und inhalativer Provokation im Vergleich zu vorher signifikant ($p < 0,001$) an. In nicht-sensibilisierten wt-Tieren fand sich keine Induktion von IgG₁ (Abb 19).

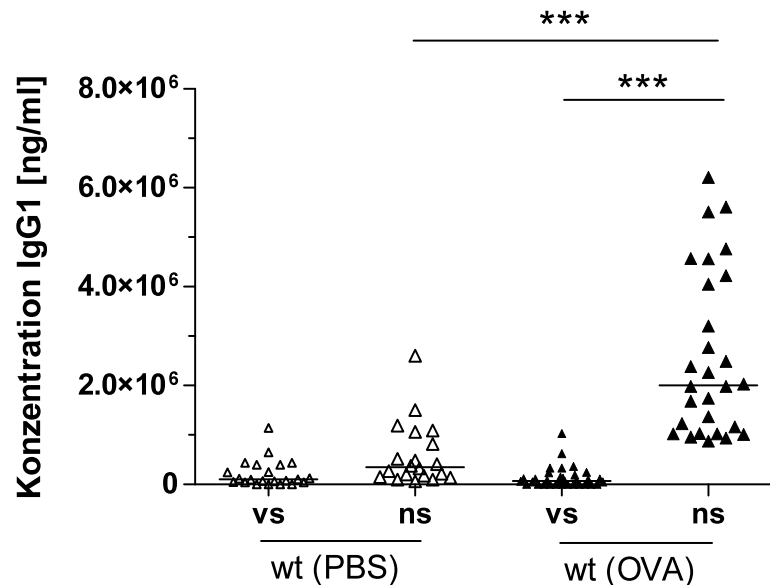


Abb. 19 IgG₁ Serumspegel in wt-Tieren

Die mit OVA sensibilisierten Mäuse (OVA) zeigten nach Sensibilisierung eine signifikante Zunahme des Serum-IgG₁-Spiegels. Bei den Kontrolltieren (PBS) blieben die IgG₁-Spiegel vor und nach Sensibilisierung gleich. Nicht-sensibilisierte wt-Tiere unterschieden sich signifikant von sensibilisierten Tieren.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Die transgenen Mauslinien zeigten nach Sensibilisierung beide einen signifikanten Anstieg des IgG₁-Spiegels. Dieser Anstieg war mit dem der wt-Tiere vergleichbar. So unterschieden sich die Serum IgG₁-Spiegel der Δ D-iD- und Δ D-DFL-Tiere nach Sensibilisierung nicht signifikant von denen der wt-Tiere (Abb.).

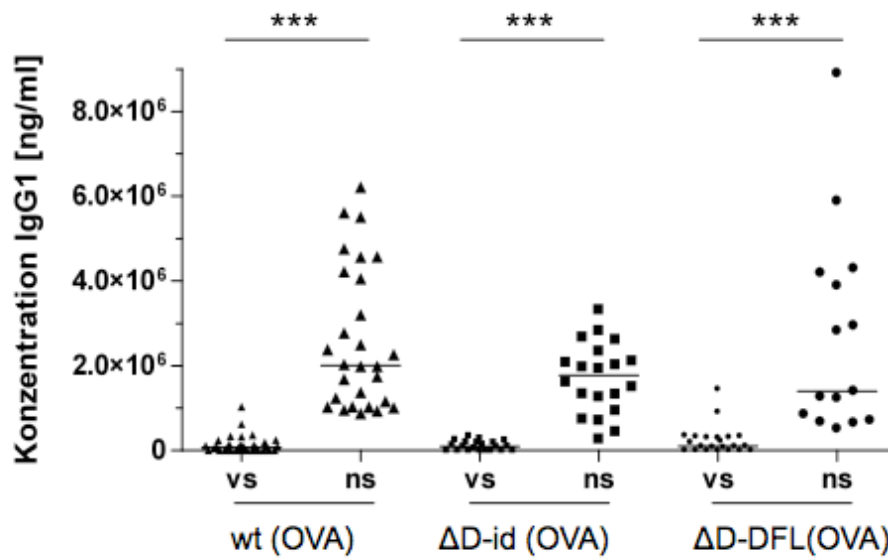


Abb. 20 IgG₁ Serumspegel in ΔD-id- und ΔD-DLF-Tieren

Sowohl in ΔD-id-, als auch in ΔD-DLF-Tieren konnten nach Sensibilisierung im Vergleich zu vor Sensibilisierung signifikant erhöhte Spiegel des IgG₁ nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu den wt-Tieren ließen sich weder bei den ΔD-id-Tieren noch bei den ΔD-DLF-Tieren nach Sensibilisierung veränderte Serumspegel des IgG₁ nachweisen.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

4.1.3 IgE-Spiegel

Vor Versuchsbeginn lagen die IgE-Spiegel aller Versuchsgruppen unter der Nachweisgrenze. Dieser stieg bei den wt (PBS)- Kontrolltieren auch nach intraperitonealer und inhalativer PBS-Provokation nicht an. Nach OVA-Sensibilisierung jedoch zeigten sich bei den wt-Tieren signifikant ($p < 0,001$) erhöhte IgE-Spiegel im Serum.

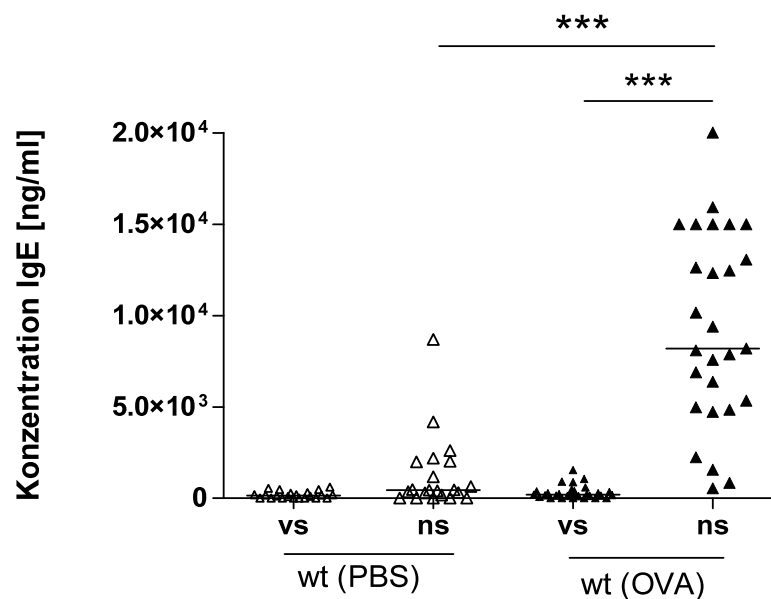


Abb. 21 IgE Serumspegel in wt-Tieren

Während vor Sensibilisierung die IgE-Spiegel unter der Nachweisgrenze lagen, führt die Sensibilisierung mit OVA zu einer starken Induktion der IgE-Produktion. So fanden sich nach Sensibilisierung signifikant ($p < 0,001$) erhöhte IgE-Spiegel in wt-Tieren.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Auch bei den transgenen Mäusen zeigten sich nach Sensibilisierung im Vergleich zu vorher signifikant erhöhte IgE-Spiegel im Serum. Die IgE-Spiegel nach Sensibilisierung der ΔD -id-Tiere waren jedoch signifikant ($p < 0,001$) geringer im Vergleich zu den wt-Tieren.

Ebenso fanden sich bei den ΔD -DFL-Tieren im Vergleich zur wt-Kontrolle signifikant erniedrigte Serum-IgE-Spiegel (Abb 22).

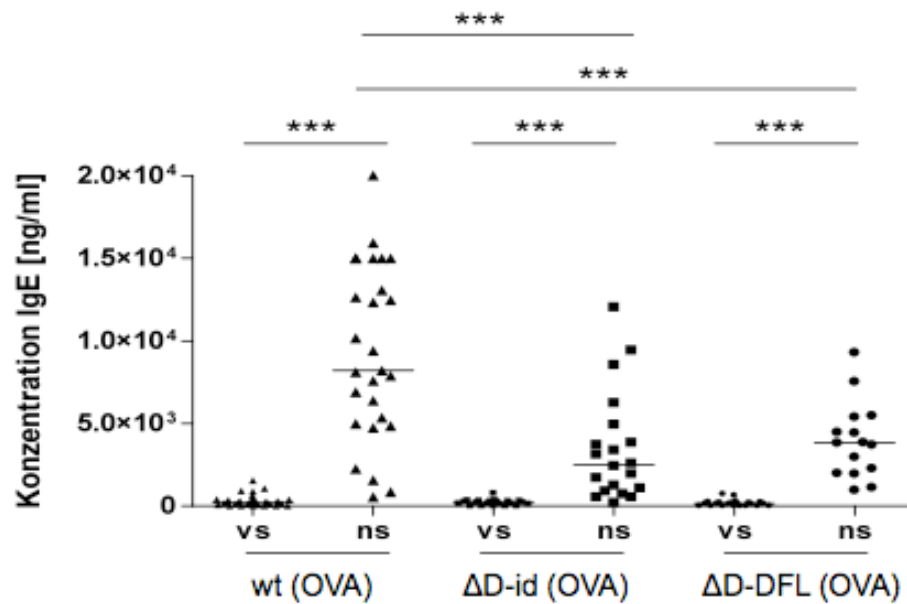


Abb. 22 IgE Serumspiegel in ΔD -id- und ΔD -DFL-Tieren

Alle Versuchsgruppen zeigten nach Sensibilisierung einen signifikanten Anstieg der IgE-Serumkonzentration. Dieser Anstieg war jedoch bei den ΔD -id- und ΔD -DFL-Tieren signifikant abgeschwächt. So zeigten die transgenen Mauslinien signifikant verminderte IgE-Spiegel im Vergleich zu den wt-Tieren.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

*** $p \leq 0,001$

4.1.4 IgG_{2A}-Spiegel

Nach Sensibilisierung ließ sich bei allen Genotypen ein signifikanter Anstieg im Serum IgG_{2A} nachweisen. Zwischen den beiden Mäuse-Genotypen und den wt-Tieren konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden (Abb 23, Abb. 24).

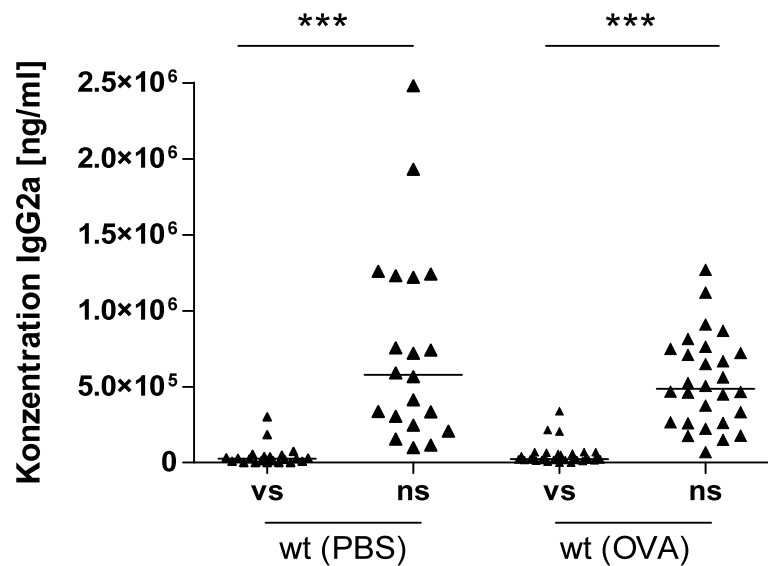


Abb. 23 Serumspiegel IgG_{2a} in wt-Tieren

Es konnte in wt-Tieren eine signifikante Zunahme der Serum-IgG_{2a}-Spiegel in sensibilisierten (OVA) und in nicht-sensibilisierten (PBS) Tieren nachgewiesen werden.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

*** $p \leq 0,001$

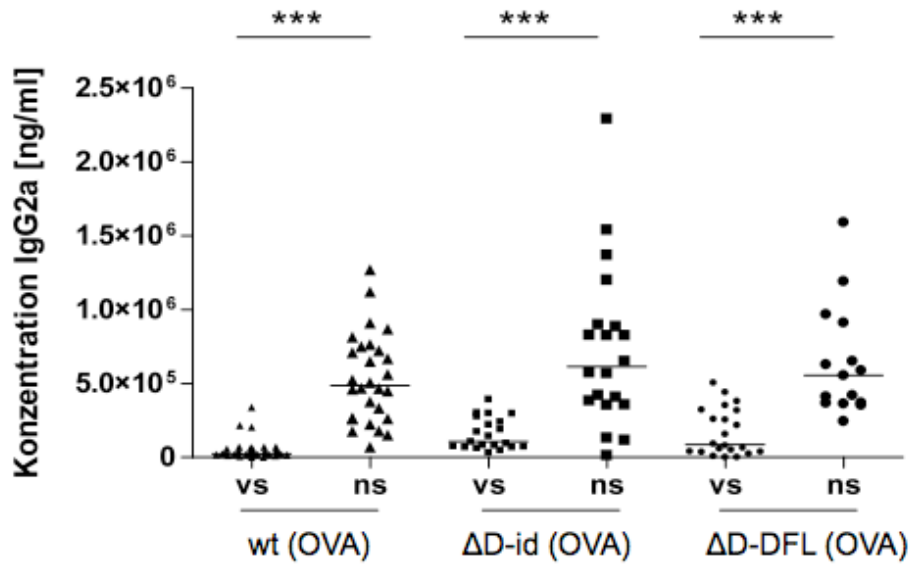


Abb. 24 Serumspiegel IgG_{2a} in ΔD -id- und ΔD -DFL-Tieren

Einen signifikanten Anstieg in der Serumkonzentration des IgG_{2A} vor und nach Sensibilisierung zeigten neben den wt-Tieren auch die ΔD -id- und die ΔD -FL-Maus.

Bei keiner der zwei untersuchten Mauslinien konnten im Vergleich zu den wt-Tieren nach Sensibilisierung signifikante Unterschiede im Serum IgG_{2A} nachgewiesen werden.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

*** $p \leq 0,001$

4.1.5 OVA-spezifisches IgE

Zur Quantifizierung des Allergen-spezifischen IgE im Serum wurde mittels ELISA OVA-spezifisches IgE gemessen.

Vor Sensibilisierung lagen bei allen Versuchstieren die OVA-spezifischen IgE-Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze. In nicht sensibilisierten wt-Tieren konnten auch nach PBS-Inhalationen keine OVA-spezifischen IgE-Spiegel nachgewiesen werden (Abb.). Die mit OVA sensibilisierten wt-Tiere hingegen zeigten nach Allergenprovokation einen signifikanten Anstieg des OVA-spezifischen IgEs

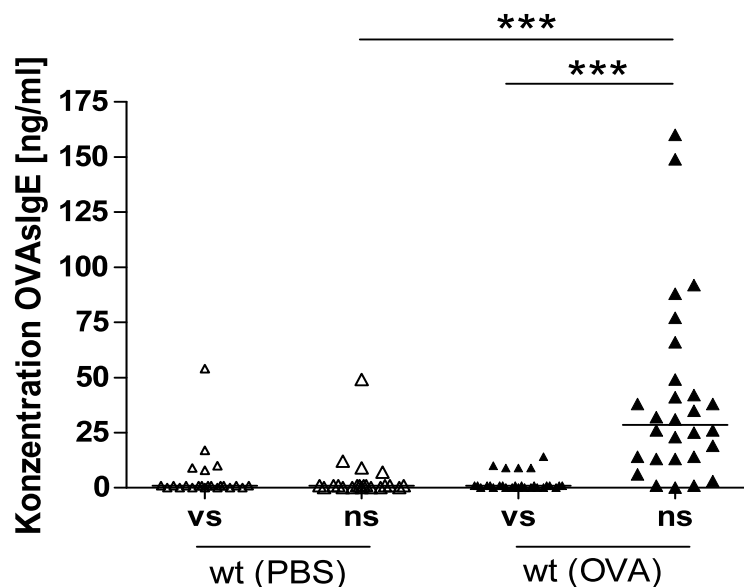


Abb. 25 OVA-spezifische IgE-Serumspiegel in wt-Tieren

Die mit OVA sensibilisierten Mäuse zeigten nach Sensibilisierung eine signifikante Zunahme im Serumspiegel des OVA-spezifischen IgEs. Bei den Kontrolltieren (PBS) blieben die OVA-spezifischen IgE-Spiegel vor und nach Sensibilisierung nicht nachweisbar. Nicht-sensibilisierte und sensibilisierte wt-Tiere unterschieden sich nach Sensibilisierung signifikant voneinander.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

*** $p \leq 0,001$

Auch in sensibilisierten ΔD -id-Tieren kam es zu einem OVA-induzierten IgE-Anstieg. Dieser Anstieg war jedoch deutlich ($p=0,0549$) geringer als bei der wt-

Kontrollgruppe. Bei den Δ D-DFL- Tieren hingegen war der Anstieg des OVA-spezifischen IgE-Spiegels vergleichbar mit dem der wt-Tiere (Abb.).

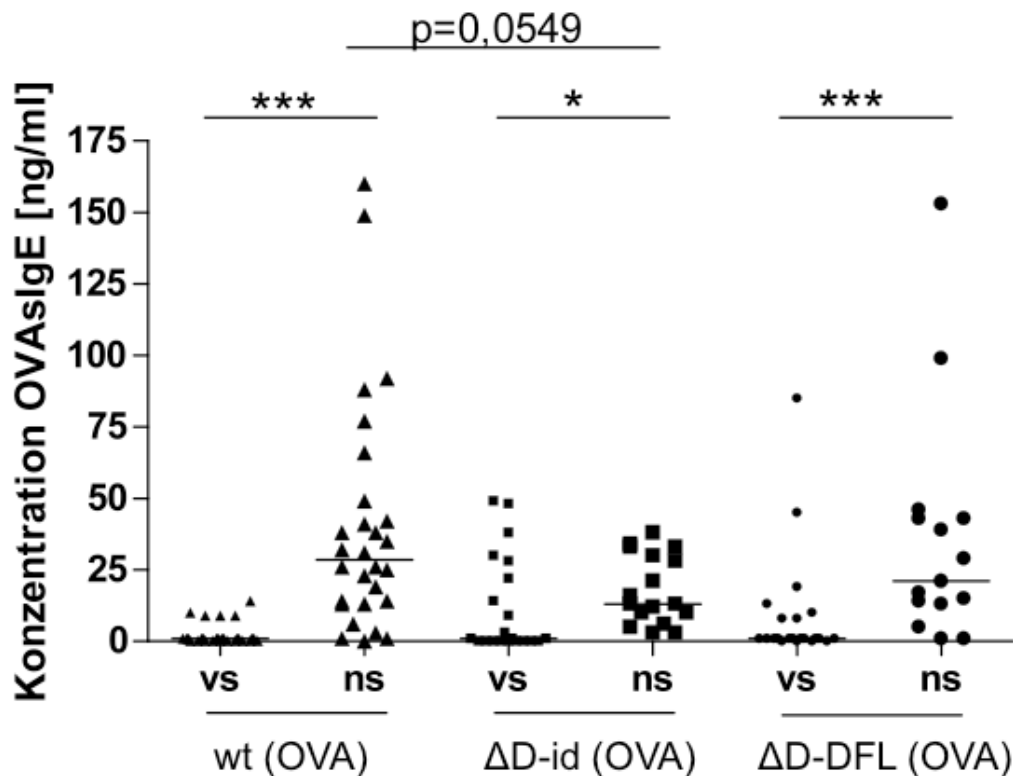


Abb. 26 Serumspiegel OVA spezifisches IgE in Δ D-id- und Δ D-DFL-Tieren

Einen Anstieg in der Serumkonzentration des OVA spezifisches IgE vor und nach Sensibilisierung zeigten alle Tiergruppen.

Nach Sensibilisierung unterschieden sich die Δ D-id-Tiere deutlich ($p=0,0549$) von der wt-Kontrolle durch erniedrigte OVA spezifische IgE-Spiegel. Δ D-DFL- Tiere unterschieden sich nach Sensibilisierung hingegen nicht von der wt- Kontrolle.

vs = vor Sensibilisierung; ns = nach Sensibilisierung

* $p<0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$

Insgesamt stellt das OVA-spezifische IgE nur einen geringen Anteil am Gesamt-IgE im Serum dar. Im Mittel wurden bei wt (OVA) etwa 40 ng/ml OVA-spezifisches IgE gemessen, wobei der Gesamt-IgE-Spiegel im Mittel bei 1×10^4 ng/ml lag.

4.2 Entzündungsreaktion

Um den Einfluss der CDR-H3-Region auf die lokale allergische Atemwegsentzündung zu evaluieren, wurden die Tiere einer 24 fachen Exposition gegenüber einem OVA-Aerosol ausgesetzt (vgl. Abb 6).

4.2.1 Zellverteilung in der BAL

Zur Beurteilung der Atemwegsentzündung wurden zunächst die Gesamtzellzahl und anschließend die Zellverteilung in der BALF bestimmt. Das Differenzial-Zellbild in nicht-sensibilisierten Tieren wurde von Alveolarmakrophagen dominiert. Während nicht sensibilisierte wt-Tiere keine Eosinophilie der BAL zeigten, kam es durch die aerosolische OVA-Provokation in den sensibilisierten Tieren (OVA-Tiere) zu einer starken Rekrutierung eosinophiler Granulozyten. In sensiblisierten wt-Tieren konnte eine starke Atemwegseosinophilie nachgewiesen werden (Abb 27).

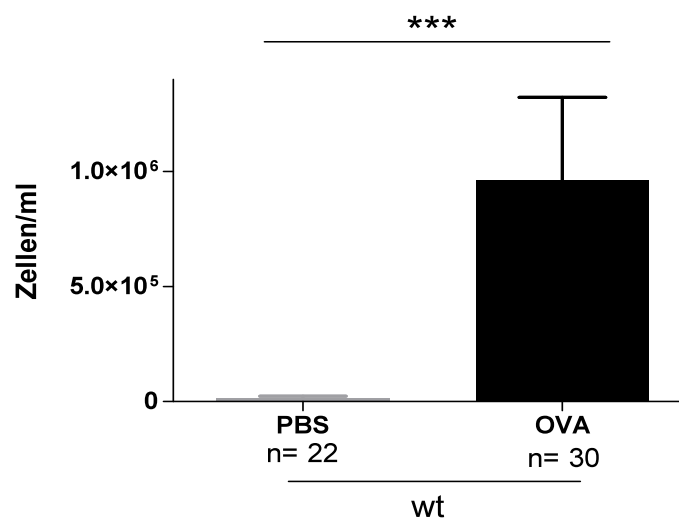


Abb. 27 Eosinophile Granulozyten in wt-Tieren in der BALF

In der Gruppe der wt-Tiere konnte zwischen nicht-sensibilisierten Tieren (PBS) und sensibilisierten Tieren (OVA) ein signifikanter Unterschied in der Zahl der eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden.

*** $p \leq 0,001$

Auch bei den transgenen Mauslinien konnte durch aerosolische OVA-Provokation ein signifikanter Eosinophilen-Influx in die Atemwege induziert werden. Jedoch zeigten die mit OVA sensibilisierten ΔD -id-Tiere eine deutlich geringere Atemwegseosinophilie als die wt-Tiere. Dieser Unterschied war aber nicht signifikant. Die Atemwegseosinophilie der ΔD -DFL-Tiere ist mit der der wt-Tiere vergleichbar.

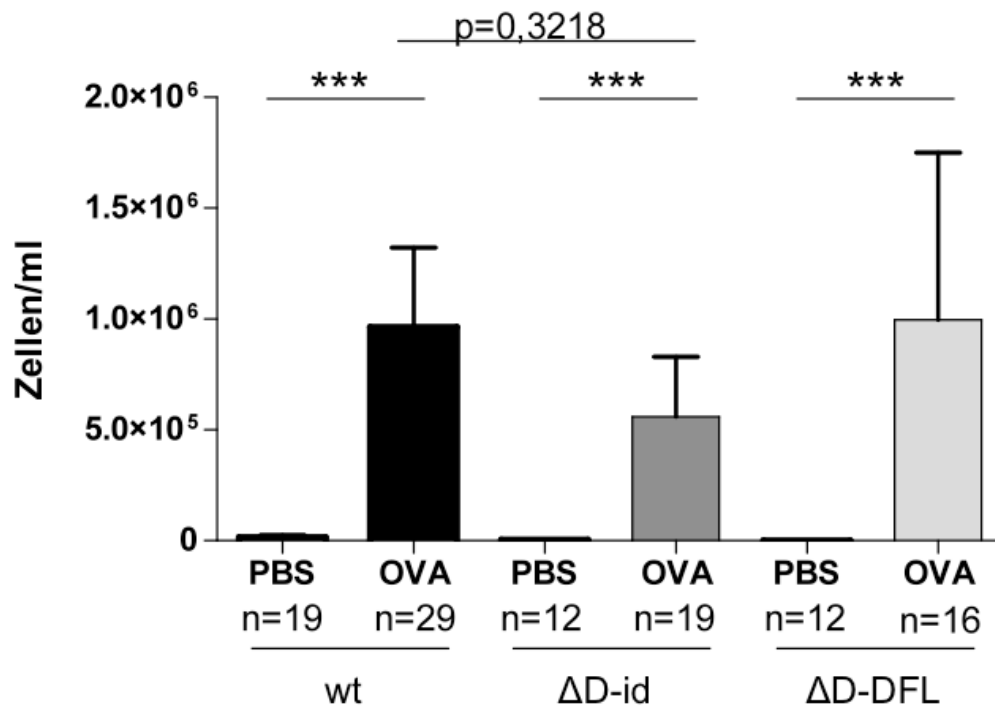


Abb. 28 Eosinophile Granulozyten in der BALF

In allen Mauslinien ließ sich durch OVA-Provokation eine eosinophile Atemwegsentzündung induzieren. Sensibilisierte ΔD -id-Tiere zeigten eine deutlich geringere Eosinophilen-Anzahl in der BAL als wt-Tiere. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

ΔD -DFL-Tiere zeigten eine vergleichbare Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BALF wie die wt-Tiere.

*** $p \leq 0,001$

Im Vergleich der anderen Zellklassen ließen sich zwischen den Genotypen keine Unterschiede nachweisen. Jedoch zeigten sich innerhalb der Tiergruppen Unterschiede zwischen sensibilisierten und nicht-sensibilisierten Tieren (Tab 8).

In der Gruppe der ΔD -id-Tiere fand sich zwischen sensibilisierten ($n=19$) und nicht sensibilisierten ($n=12$) Tieren ein signifikanter Unterschied in der Zahl der eosinophilen Granulozyten ($p<0,001$), der neutrophilen Granulozyten ($p<0,01$) und der Lymphozyten ($p<0,01$). Jedoch konnte in keiner Zellgruppe ein Unterschied zu den wt-Tieren gefunden werden. In der Gruppe der ΔD -DFL-Tiere ließen sich zwischen sensibilisierten und nicht sensibilisierten Tieren ebenso in der Zellklasse der eosinophilen Granulozyten ($p<0,001$), der neutrophilen Granulozyten ($p<0,01$) und der Lymphozyten ($p<0,01$) signifikante Unterschiede nachweisen. Es bestanden keine Unterschiede zur wt-Kontrollgruppe.

Tab. 8 Zellverteilung der BALF

Zahlenwerte der Tabelle in 10^4 /ml.

Genotyp		Eosinophile	Neutrophile	Makrophagen	Lymphozyten
wt	(PBS) n=19	$1,6 \pm 0,8$	29 ± 27	1170 ± 690	$2,4 \pm 1,3$
	(OVA) n=29	96 ± 36	$46x \pm 18$	652 ± 204	29 ± 12
ΔD -id	(PBS) n=12	$0,4 \pm 0,3$	$0,47 \pm 0,21$	357 ± 146	$1,4 \pm 0,46$
	(OVA) n=19	56 ± 27	$6,4 \pm 1,4$	257 ± 63	$4,6 \pm 0,86$
ΔD -DFL	(PBS) n=12	$0,02 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,41$	240 ± 87	$1,4 \pm 0,41$
	(OVA) n=16	100 ± 75	$16 \pm 8,9$	670 ± 480	19 ± 14

4.2.2 Interleukin 5 in der BAL

Die IL-5 Spiegel in der BAL wurden mittels ELISA bestimmt. Sämtliche IL-5-Spiegel waren jedoch unterhalb des Detektionslimits von 10pg/ml und somit nicht messbar.

4.3 Lungenfunktion

Zur Evaluation der Atemwegsreagibilität erfolgte eine Head-out Bodyplethysmographie zur *in vivo* Lungenfunktionsmessung in Reaktion auf den inhalativen Stimulus Methacholin. Die Darstellung der Atemfunktion erfolgte mittels MEF-Werten („*mid expiratory flow*“).

Die Tiere zeigten einen dosisabhängigen Abfall des MEF-Wertes. Die mit OVA sensibilisierten Tiere reagierten schon bei sehr geringen Konzentrationen des Methacholins mit einem Abfall des *mid expiratory flow*. Die PBS-Tiere hingegen tolerierten deutlich höhere Methacholin-Konzentrationen bis es zu einer Reaktion der Atemwege kam und somit zu einer messbaren Einschränkung der Expiration (Abb 29).

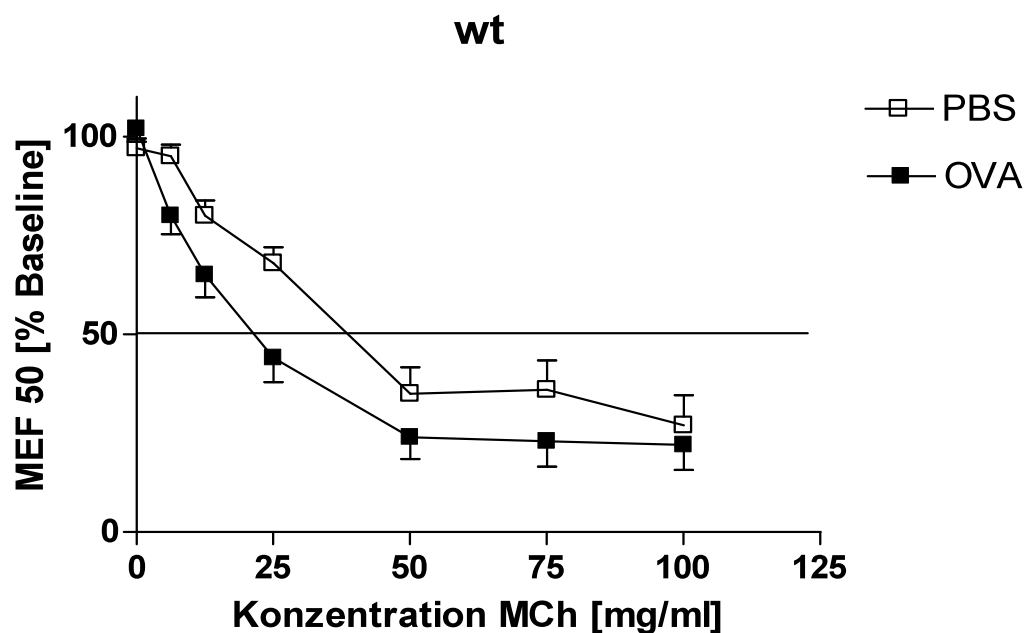


Abb. 29 Methacholin-Response in wt-Tieren

Die wt-Tiere zeigten einen dosisabhängigen Abfall des MEF-Wertes. Sensibilisierte Tiere (OVA) reagierten jedoch bereits bei deutlich kleineren Methacholin-Konzentrationen als nicht sensibilisierte Kontroll-Tiere (PBS).

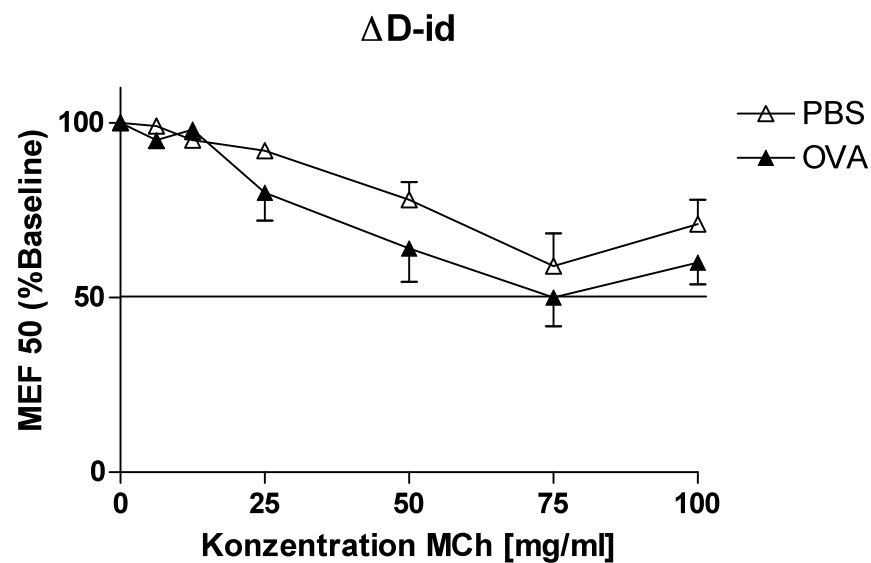


Abb. 30 Methacholin-Response in ΔD -id-Tieren

Sensibilisierte ΔD -id-Tiere (OVA) reagieren mit dem gleichen Abfall des MEF-Wertes wie nicht sensibilisierte Tiere (PBS). Es kann in den mit OVA sensibilisierten ΔD -id-Tieren trotz allergischer Atemwegsentzündung keine AHR induziert werden.

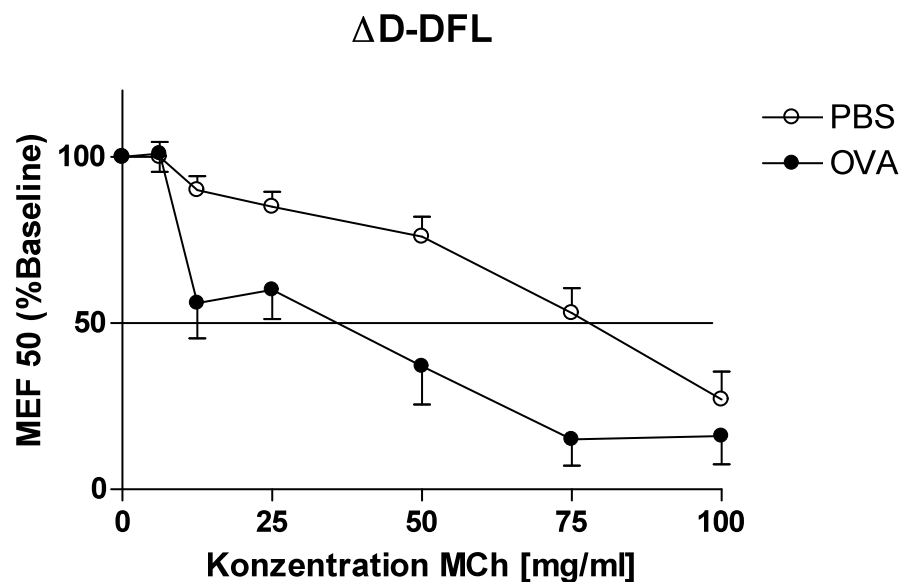


Abb. 31 Methacholin-Response in ΔD -FL-Tieren

Die ΔD -FL-Tiere zeigten einen dosisabhängigen Abfall des MEF-Wertes. Die sensibilisierten ΔD -FL-Tiere (OVA) zeigten einen deutlich stärkeren Abfall. In ihnen konnte somit eine AHR induziert werden.

Der PC_{50} -Wert ist die Methacholinkonzentration, die zu einer Reduktion des MEF-Wertes auf 50% der Baseline führt. Der PC_{50} -Wert unterschied sich bei sensibilisierten und nicht-sensibilisierten wt-Tieren signifikant (Abb.). Nach Applikation von 50 mg/ml Methacholin wurde bei den Kontroll-Tieren die Halbierung des MEF-Wertes erreicht. Die sensibilisierten Tiere hingegen reagierten schon bei 23 mg/ml Methacholin mit einer Halbierung des MEF-Wertes ($p < 0,01$), was als Atemwegshyperreagibilität zu werten ist.

In der Gruppe der ΔD -id-Tiere ließ sich kein Unterschied des PC_{50} -Wertes zwischen PBS- und OVA-Tieren nachweisen. Nicht-sensibilisierte ΔD -id-Tiere benötigten im Mittel 66 mg/ml Methacholin, sensibilisierte Tiere 60 mg/ml um mit einer 50%igen Reduktion des MEF-Wertes zu reagieren. In sensibilisierten ΔD -id-Tieren war somit die OVA-induzierte Atemwegshyperreagibilität aufgehoben. Der Vergleich zwischen sensibilisierter wt-Kontrollgruppe und sensibilisierter ΔD -id-Gruppe zeigte einen signifikanten Unterschied im PC_{50} -Wert ($p < 0,01$). (Abb 32)

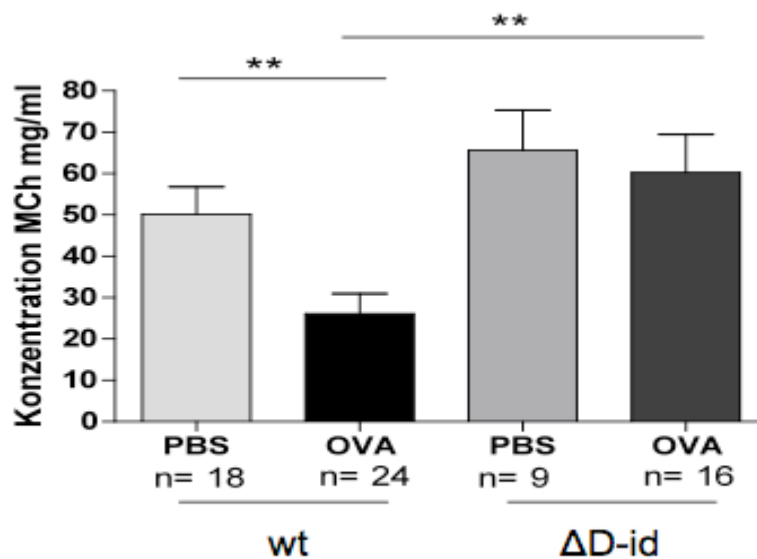


Abb. 32 PC_{50} -Werte ΔD -id- und wt-Tiere

Zwischen sensibilisierten (OVA) wt- und ΔD -id-Tieren ergab sich ein signifikanter Unterschied im PC_{50} -Wert

** $p \leq 0,01$

In der Gruppe der Δ D-DFL-Tiere zeigte sich ein signifikanter Unterschied im PC_{50} -Wert zwischen sensibilisierten und nicht-sensibilisierten Tieren. Bei Applikation von im Mittel 61 mg/ml Methacholin reagierten nicht sensibilisierte Δ D-DFL-Tiere mit einer Reduktion des MEF-Wertes um 50 %, sensibilisierte Δ D-DFL Tiere benötigten im Mittel 57 mg/ml.

Zwischen sensibilisierten Δ D-DFL- und wt-Tieren ließ sich kein signifikanter Unterschied im PC_{50} -Wert zeigen (Abb 33).

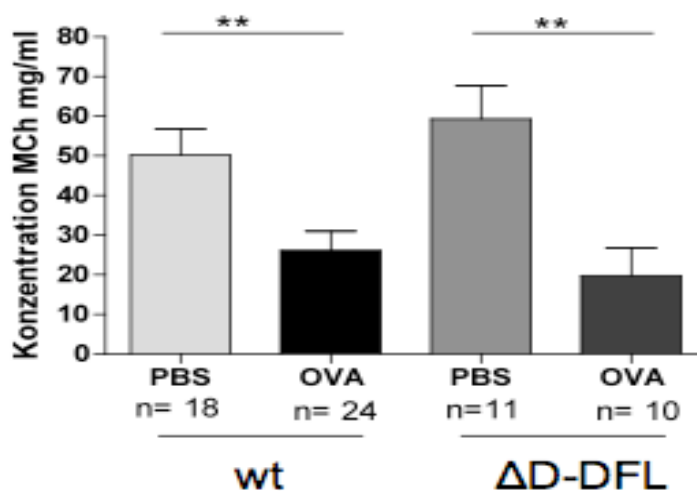


Abb. 33 PC_{50} -Werte Δ D-DFL- und wt-Tiere

Sensibilisierte Δ D-DFL-Tiere (OVA) zeigten eine deutliche AHR, da sie bereits bei Methacholin-Konzentrationen von 20 mg/ml mit einer 50%igen Reduktion des MEF-Wertes reagierten. Im Gegensatz dazu benötigten die nicht-sensibilisierten Tiere (PBS) im Mittel eine Applikation von 59 mg/ml Methacholin.

Zur der entsprechenden wt-Kontrollgruppe ließ sich jedoch kein Unterschied zeigen.

** $p \leq 0,01$

Zusammenfassend fand sich ein dosisabhängiger Abfall der MEF_{50} -Werte auf inhalative Provokation mit Methacholin. Dieser Abfall war bei den sensibilisierten wt- und Δ D-DFL-Tieren deutlich und signifikant verstärkt. Nicht jedoch konnte dieser Abfall bei den sensibilisierten Δ D-id-Tieren gezeigt werden. Sie reagierten vielmehr vergleichbar mit den nicht sensibilisierten Tieren. Es konnte in den Δ D-id-Tieren trotz allergischer Atemwegsentzündung keine AHR induziert werden.

4.4 Quantitative Histologie

Zwischen nicht sensibilisierten und sensibilisierten Tieren ließ sich ein signifikanter Anstieg des Becherzellanteils nachweisen. Dieser Anstieg unterschied sich jedoch nicht zwischen wt- und ΔD -id-Tieren. So konnten zwischen sensibilisierten wt- und ΔD -id-Tieren keine Unterschiede im Becherzellanteil festgestellt werden.

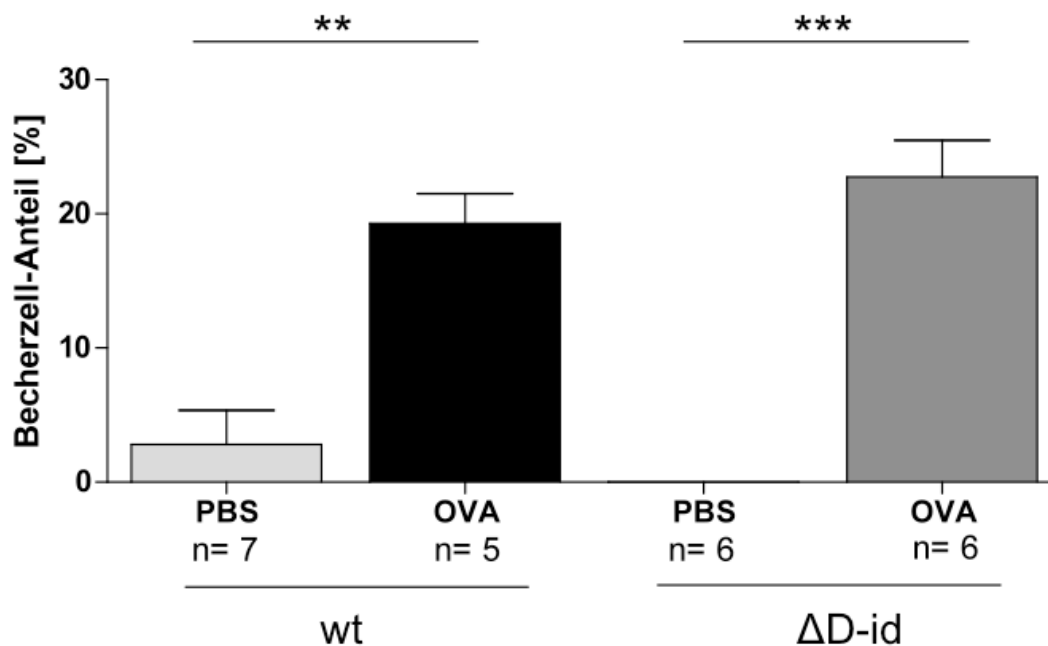


Abb. 34 Becherzellanteil der Lungen in wt- und ΔD -id-Tieren

Der Becherzellanteil in % in wt- und ΔD -id-Tieren.

Zwischen sensibilisierten (OVA) und nicht-sensibilisierten (PBS) wt- Kontrolltieren fand sich ein signifikanter Anstieg in Muzingehalt und Becherzellanteil der sensibilisierten Tiere. Äquivalent dazu stieg auch der Muzin- und Becherzellanteil in sensibilisierten ΔD -id-Tieren signifikant an.

** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

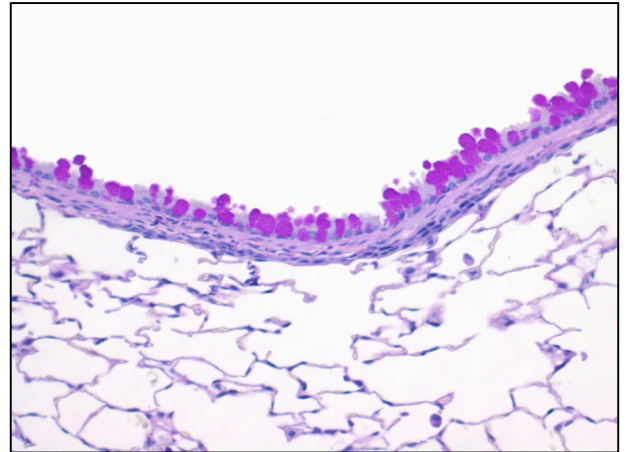
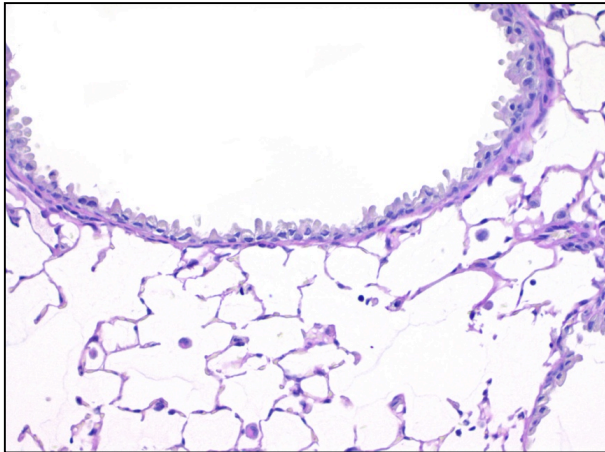


Abb. 35 Lungenquerschnitte wt-Tiere

Links: Nicht sensibilisierte (PBS) Kontrolltiere

Rechts: Sensibilisierte (OVA) Tiere

Durch Sensibilisierung mit OVA deutliche Zunahme an Becherzellen, der glatten Muskulatur und des Epithels. Quantifiziert wurden diese Veränderungen als Luft/Epithel-Quotient und Becherzellgehalt (in %).

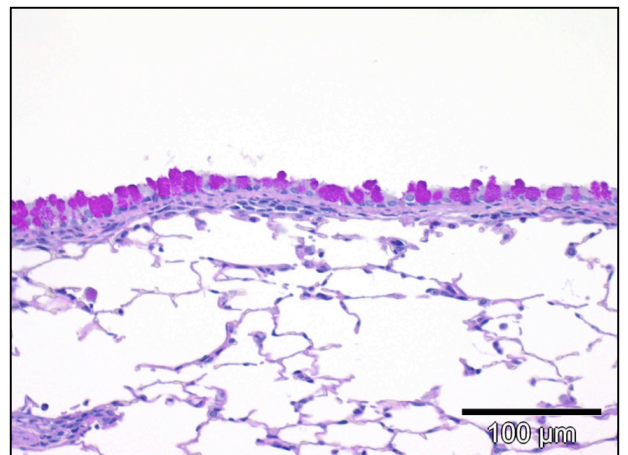
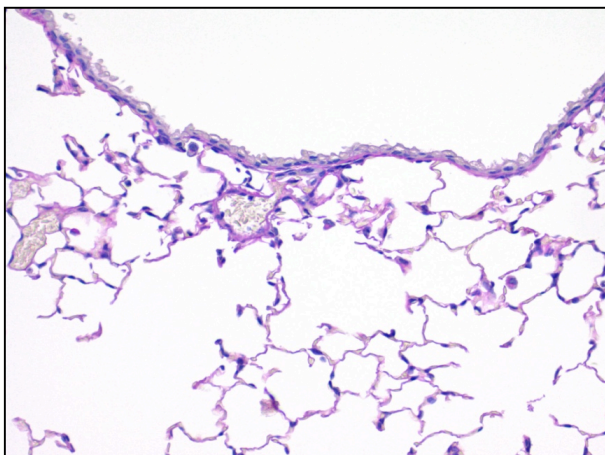


Abb. 36 Lungenquerschnitte ΔD -id-Tiere

Links: Nicht sensibilisierte (PBS) Kontrolltiere

Rechts: Sensibilisierte (OVA) Tiere

Durch Sensibilisierung mit OVA deutliche Zunahme an Becherzellen, der glatten Muskulatur und des Epithels. Quantifiziert wurden diese Veränderungen als Luft/Epithel-Quotient und Becherzellgehalt (in %).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Bedeutung der CDR-H3-Region in einem murinen Modell der chronischen allergischen Atemwegsentzündung zu charakterisieren. Dabei wurden die vier fundamentalen Aspekte des Phänotyps der allergischen Atemwegsentzündung charakterisiert: die allergische Sensibilisierung (IgE-Serumspiegel), die allergische Atemwegsentzündung (Zellverteilung in der BAL), die Atemwegshyperreagibilität (Atemtest) und der irreversible Atemwegsumbau (Histologie).

Die *in vivo* Untersuchungen an der Maus zeigten eine relevante Bedeutung der CDR-H3-Region auf die Entwicklung allergietypischer Merkmale der chronischen Atemwegsentzündung. Bei der systemischen Sensibilisierung ließen sich anhand der IgE-Spiegel im Serum signifikante Unterschiede zwischen sensibilisierten ΔD -id- und den wt-Tieren zeigen. Zwischen ΔD -DFL-Tieren und der wt-Kontrollgruppe konnten ebenso Unterschiede in den IgE-Spiegeln im Serum nachgewiesen werden.

Bezüglich der allergischen eosinophilen Atemwegsentzündung ließen sich in der bronchoalveolären Lavage keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und der Kontrollgruppe nachweisen.

Sensibilisierte wt-Tiere zeigten analog zum akuten Modell eine deutlich erhöhte Atemwegsreagibilität auf den inhalativen Stimulus Methacholin im Vergleich zu nicht-sensibilisierten Tieren. Sensibilisierte ΔD -id-Tiere jedoch zeigten gegenüber den nicht-sensibilisierten ΔD -id-Tieren keine erhöhte Atemwegsreagibilität. Es konnte in sensibilisierten ΔD -id-Tieren keine AHR provoziert werden. Trotz systemischer Sensibilisierung und inhalativer Provokation mit OVA reagierten ΔD -id-Tiere nicht mit einer reversiblen Atemwegsobstruktion auf die Provokation mit Methacholin.

5.2 Kritische Betrachtung des verwendeten Modells

Obwohl das murine Modell der chronischen allergischen Atemwegsentzündung als ein geeignetes Modell zur Darstellung der humanen chronischen Atemwegsentzündung akzeptiert ist (Glaab et al. 2001, Leong und Huston 2001), besteht dennoch natürlich für jedes Tiermodell eine eingeschränkte Übertragbarkeit auf die klinische Situation beim Patienten. Es bestehen Unterschiede in Anatomie und Physiologie zwischen murinem und humanem Bronchial- und Immunsystem.

Zu den mikroanatomischen Unterschieden zählen vor allem folgende Aspekte: In den Hauptbronchien befinden sich in der Maus nur ca. 1% Becherzellen, während sie beim gesunden Menschen bis zu 26% der Zellen ausmachen (Mariassy 1992). Die Maus besitzt eine sichtbare Lamina propria und keine effektive Blutversorgung durch intrapulmonale Bronchialarterien (Pabst und Tschernig 2002). Außerdem weist die Maus deutlich weniger Generationen von dichotom geteilten Bronchien auf, wodurch früher das Alveolarniveau erreicht wird (Glaab 1999).

Ebenso lassen sich physiologische Unterschiede zwischen Maus und Mensch aufweisen: Mäuse zeigen nur eine vorübergehende AHR nach Allergen-Provokation, während beim Menschen vor allem eine dauerhafte allergenunabhängige AHR auch im symptomfreien Intervall charakteristisch ist (Epstein 2004). Außerdem ist die AHR in der Maus auf Grund der schwächer ausgebildeten Bronchialmuskulatur geringer (Gleich und Kita 1997).

Das im Mausmodell benutzte Modellallergen Ovalbumin spielt im klinischen Alltag als inhalatives Allergen keine Rolle. Des Weiteren spielt auch der im Mausmodell genutzte intraperitoneale Sensibilisierungsweg beim Patienten keine Rolle. Er stellt eine unnatürliche Weise des Allergenkontaktes dar, wobei noch nicht vollständig geklärt ist, ob die Inhalation des Allergens den alleinigen Sensibilisierungsweg beim Menschen darstellt (Epstein 2004).

Trotz dieser dargestellten Unterschiede ist es möglich, charakteristische immunologische und atemphysiologische Merkmale der chronischen allergischen Atemwegsentzündung beim Patienten mit Asthma in einem murinen Modell nachzustellen. Auf OVA sensibilisierte Tiere entwickelten eine

eosinophile Entzündungsreaktion der Lunge und einen Anstieg der Serum-Immunglobulin-Spiegel, insbesondere des IgE. Dies entspricht der humanen allergischen Immunantwort (Holgate et al. 2003, Bousquet et al. 2000). Das klinisch wichtige Merkmal der AHR im Menschen lässt sich durch inhalative Allergenprovokation auch in der Maus induzieren (Zosky et al. 2007). Insbesondere das chronische murine Modell der allergischen Atemwegsentzündung kommt dem humanen Asthma bronchiale deutlich näher als das akute Modell (Wegmann et al. 2005). Dazu tragen insbesondere die Involvierung der distalen Atemwege in Entzündungs- und Umbauvorgänge bei. Durch das Mausmodell der chronischen Atemwegsentzündung lässt sich zwar keine vollständige Übertragbarkeit auf die Situation im Menschen gewährleisten, aber es können die für die vorliegende Fragestellung relevanten Kriterien im murinen Modell nachvollzogen werden.

5.3 Rolle der CDR-H3-Region bei der allergischen Immunantwort

5.3.1 Bedeutung der CDR-H3-Region für die systemische Sensibilisierung

Zur Evaluation der systemischen Immunantwort erfolgte die Bestimmung der OVA-spezifischen IgE-Spiegel. Alle Tiere zeigten nach Sensibilisierung deutliche Anstiege der Serumspiegel. Dieser Anstieg war jedoch bei den ΔD -id-Tieren, im Vergleich zur wt-Kontrolle, signifikant abgeschwächt. Hingegen konnten zwischen ΔD -DFL- und wt-Tieren nach Sensibilisierung keine Unterschiede festgestellt werden. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zum akuten Asthmodell konnten ähnliche Ergebnisse gezeigt werden (Kerzel et al. 2009).

Kim et al. konnten zeigen, dass der OVA-spezifische IgE-Spiegel vier Wochen nach Sensibilisierung sein Maximum erreicht, um anschließend wieder zu sinken (Kim et al. 2007). Während im akuten Modell die OVA spezifischen IgE-Spiegel bei den wt-Tieren 100 ng/ml betrugen, wurden im chronischen Modell nur Spiegel von 40 ng/ml gefunden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit

den Ergebnissen von Kim et al. und spiegeln die Kinetik der OVA- spezifischen IgE-Spiegel wider. In ΔD -id-Tieren betrugen die mittleren OVA- spezifischen IgE-Spiegel nur 18 ng/ml und unterschieden sich damit signifikant von den wt-Tieren. Die CDR-H3-Region nimmt also entscheidenden Einfluss auf die systemische Sensibilisierung.

Nun stellt sich die Frage, wie die deutlich reduzierten IgE-Spiegel bei den ΔD -id-Tieren zu erklären sind.

Ein Mechanismus, der zu erniedrigten IgE-Spiegeln in ΔD -id-Tieren führen könnte, ist eine gestörte Epitop/Paratop-Interaktion. Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist eine reversible, nichtkovalente Interaktion. Es wirken elektrostatische Kräfte, hydrogenne Bindungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Kräfte (Braden et al. 1998). Die hydrophile/hydrophobe Interaktion stellt dabei eine der Hauptkräfte der Bindung dar (James et al. 2003). ΔD -id-Tiere besitzen eine bevorzugt hydrophile CDR-H3-Region. Diese könnte deswegen in ihrer Interaktion mit den vorwiegend hydrophoben Epitopen des Allergens OVA behindert sein (Mine und Yang 2007). Während der allergischen Sensibilisierung findet ein Selektionsprozess statt, in dem die B-Zellen zu Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen reifen (Rajewsky 1996). Es ist denkbar, dass in ΔD -id-Tieren auf Grund der gestörten Interaktion zwischen Allergen und Antikörper weniger B-Zellen selektiert werden, woraus eine geringere Gesamtanzahl an reifen Plasmazellen resultieren würde. Diese geringere Gesamtzellzahl würde entsprechend weniger IgE produzieren. Die gestörte Interaktion zwischen Epitop und Paratop könnte so letztendlich zu erniedrigten IgE-Spiegeln führen.

Des Weiteren könnte eine Rolle spielen, dass wegen der Limitierung auf nur einen D_H -Lokus in ΔD -id-Tieren, die Fähigkeit in der Ausbildung einer allergischen Immunantwort behindert wird. Um dies zu überprüfen, wurden ΔD -DFL-Tiere untersucht, die auch nur einen D_H -Lokus besitzen. Dieser ist aber in der Aminosäurezusammensetzung dem wt-Repertoire ähnlich. Diese Tiere zeigten einen Anstieg der OVA-spezifischen IgE Spiegel nach Sensibilisierung, welcher sich aber nicht von dem der wt-Tiere unterschied. Analog dazu sind die Ergebnisse des akuten Asthmodells. ΔD -DFL-Tiere sind also in der Lage eine adäquate, der wt-Kontrolle entsprechende Immunantwort auszubilden.

Hieraus kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass ein einzelnes DH-Gensegment für die Ausbildung des Asthma-Phänotyps in unserem murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung ausreichend ist. Der Unterschied zwischen wt und Δ D-id-Tieren kann folglich nicht durch die Einengung auf ein DH-Segment erklärt werden.

Des Weiteren unterschieden sich die Serumspiegel des IgG₁ und IgG_{2A} der Δ D-DFL- und Δ D-id-Tiere nach Sensibilisierung nicht von denen der wt-Tiere. Daher schlussfolgern wir, dass auch Δ D-id-Tiere in der Lage sind eine adäquate Immunantwort auszubilden.

Unsere Ergebnisse der signifikant erniedrigten OVA-spezifischen IgE-Spiegel in Δ D-id-Tieren sprechen gegen die Interaktion des Allergens OVA als Superantigen. OVA scheint vielmehr mit der klassischen Antigenbindungsstelle, insbesondere der CDR-H3-Region des Antikörpermoleküls zu interagieren. Denn würde das Allergen an eine FR-Region binden, dürfte eine qualitativ veränderte CDR-H3-Region keinen Einfluss auf die systemische Sensibilisierung haben.

5.3.2 Bedeutung der CDR-H3-Region für die allergische Atemwegsentzündung

Die allergische Atemwegsentzündung ist insbesondere gekennzeichnet durch das Einwandern von Entzündungszellen, wobei den eosinophilen Granulozyten eine besondere Rolle zukommt. Sie tragen als Effektorzellen zur Erhaltung und Verstärkung der Entzündungsreaktion bei (Maddox und Schwartz 2002). Durch das von T_H2-Zellen produzierte IL-4 und IL-5 wird die Reifung und Einwanderung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge induziert (Busse und Lemanske 2001). Dies stellt ein klassisches Charakteristikum der allergischen Atemwegsentzündung dar (Maddox und Schwartz 2002).

Wir konnten in allen Tiergruppen bei sensibilisierten Tieren im Vergleich zu nicht-sensibilisierten Tieren eine Erhöhung der Eosinophilenzahl nachweisen. Es konnte also durch inhalative OVA-Provokation eine eosinophile Atemwegsentzündung induziert werden. Sensibilisierte Δ D-id-Tiere zeigten eine

leicht verminderte Eosinophilenzahl im Vergleich zur wt-Kontrolle, die jedoch nicht signifikant war. Im akuten Modell hingegen konnte eine signifikante Verminderung nachgewiesen werden. Δ D-DFL-Tiere zeigten in der vorliegenden Arbeit ähnliche Eosinophilenzahlen wie wt-Tiere, was sich auch im akuten Modell nachweisen ließ.

In anderen chronischen Asthmodellen konnte gezeigt werden, dass nach zwölfwöchiger Allergenexposition die Eosinophilenzahl der BALF niedriger ist als nach vierwöchiger Allergenexposition (Kim et al. 2007, Schramm et al. 2004). Dies ließ sich durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigen. Die Eosinophilenzahl in wt-Tieren stimmt im akuten und chronischen Modell weitgehend überein (10^6 Zellen/ml), während sensibilisierte Δ D-id-Tiere in der vorliegenden Arbeit etwa dreifach erhöhte Eosinophile in der BALF gegenüber den Δ D-id-Tieren des akuten Modells haben.

Dies kann zum einen vermuten lassen, dass die Eosinophilenzahl in Δ D-id-Tieren langsamer ansteigt als in wt-Tieren. Zum anderen könnten aber auch unterschiedliche Aktivierungswege zum Eosinophileninflux der Lunge führen. Neben der Mastzelldegranulation kann auch eine T-Zellaktivierung über Interleukine, unabhängig von IgE, eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer Atemwegseosinophilie spielen (Larché et al. 2003). In IL-4/5/9/13 *knock-out*-Mäusen konnte trotz Allergenexposition eine komplette Hemmung der allergischen Atemwegsentzündung gezeigt werden (Nath et al. 2007). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde IL-5 mittels ELISA in der BAL bestimmt. Es konnten jedoch keine messbaren IL-5-Spiegel mehr nachgewiesen werden, was in Anbetracht der Dauer des Tierversuchs im chronischen Modell nicht überrascht.

Klinisch konnte eine wichtige Rolle des IL-5 durch entsprechende monoklonale Antikörper gegen IL-5 gezeigt werden (Leckie et al. 2000). Ebenso ließen sich durch eine anti-IgE-Behandlung mit Omalizumab die Atemwegseosinophilie sowie die Anzahl der T- und B-Zellen in der Submukosa der Lunge vermindern (Djukanovic et al. 2004).

Die Atemwegsentzündung ist ein vielfältiges Charakteristikum des allergischen Asthma bronchiale mit Influx von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten

(Gibson et al. 2001). Deswegen kann man zusammenfassend sagen, dass die Atemwegseosinophilie in der chronischen Atemwegsentzündung eine weniger bedeutende Rolle spielt als in der akuten Atemwegsentzündung.

In verschiedenen murinen Modellen der chronischen Atemwegsentzündung mit langer inhalativer Allergenprovokation konnten verminderte Eosinophilenzahlen und Interleukinspiegel in der BAL nachgewiesen werden (Kim et al. 2007, Schramm et al. 2004, Sakai et al. 2001). Kim et al. berichteten von einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten (Kim et al. 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in der Gruppe der ΔD -id-Tiere bei sensibilisierten Tieren im Vergleich zu nicht-sensibilisierten Tieren ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten festgestellt werden. Im Vergleich zu sensibilisierten wt-Tieren zeigten ΔD -id-Tiere eine geringere Anzahl dieser Zellklassen in der BALF ($p=0,08$). Haldar und Pavord beschrieben dazu eine humane *noneosinophilic* Form des Asthma bronchiale, bei der auch die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Sputum erhöht ist (Haldar und Pavord 2007).

Die Atemwegseosinophilie scheint eher ein Charakteristikum der akuten allergischen Atemwegsentzündung zu sein. Für die chronische Atemwegsentzündung spielt vielmehr die AHR und das *airway remodelling* eine bedeutende Rolle.

5.3.3 Bedeutung der CDR-H3-Region für die AHR

Sensibilisierte wt-Tiere zeigen eine signifikant höhere AHR auf Methacholin als nicht sensibilisierte wt-Tiere. Es konnte also durch Sensibilisierung und inhalative Allergenprovokation eine für die Atemwegsentzündung typische Veränderung induziert werden. Analog dazu sind die Ergebnisse im Modell der akuten Atemwegsentzündung. Erstaunlicherweise jedoch konnte im chronischen Modell in sensibilisierten ΔD -id-Tieren keine AHR induziert werden. So unterschieden sich die sensibilisierten ΔD -id-Tiere in ihrer Atemwegsreagibilität nicht von den nicht-sensibilisierten Tieren. Dieser Befund ist insofern interessant, als sich diese Unterschiede nicht im akuten Asthmodell nachweisen ließen, sondern nur im chronischen Modell. Das

heißt, dass sich erst nach längerer Allergenprovokation diese Unterschiede in der Atemwegsreagibilität manifestieren. Die CDR-H3-Region beeinflusst die AHR im chronischen Asthma also entscheidend. Eine qualitativ veränderte CDR-H3-Region der Immunglobuline der ΔD -id-Tiere verhindert die Entwicklung einer AHR.

Nun stellt sich die entscheidende Frage, wie sich die Unterschiede zwischen dem akuten und chronischen Modell erklären lassen. Dazu müssen die unterschiedlichen Mechanismen, die zu einer AHR führen können, näher erörtert werden.

Für die AHR sind unter anderem Mastzellen und die durch sie ausgeschütteten Mediatoren verantwortlich, unter anderem IL-13 und IL-4 (Begueret et al. 2007, Amin et al. 2005). Sie diffundieren durch das Bronchialepithel (Bradding et al. 1994), wodurch der Zugang für Allergene in den interstitiellen Raum der Lunge und damit deren Kontakt mit dem humanen Immunsystem erleichtert wird (Brown et al. 2008). Neben den genannten Interleukinen hat auch TNF- α als Mastzellmediator eine entscheidende Bedeutung in der Entstehung einer AHR (Kim et al. 2007). Neben den Mastzellen spielt das Bronchialepithel eine bedeutende Rolle. Es stellt nicht nur eine einfache physikalische Barriere dar, sondern übt entscheidenden Einfluss auf die Atemwegshomöostase aus. Defekte des Bronchialepithels durch Entzündung können zur AHR beitragen (Qin et al. 2007). IgE als Mastzellrezeptor spielt in der Entwicklung der AHR eine entscheidende Rolle als Schnittstelle zwischen Allergen und Effektorzellen des Immunsystems. Mastzellen übernehmen jedoch nicht nur Effektorfunktion, sondern auch eine entscheidende Mediatorfunktion in der Entwicklung der AHR (Kim et al. 2007). Dieser Zusammenhang steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: ΔD -id-Tieren zeigten signifikant erniedrigte IgE-Spiegel, eine AHR ließ sich nicht induzieren. Diese Korrelation widerspricht jedoch den Ergebnissen des akuten Asthmodells, wo sich trotz signifikant erniedrigter IgE-Spiegel keine Unterschiede in der Atemwegsreagibilität nachweisen ließen. Im akuten Modell war die AHR von den IgE-Spiegeln dissoziiert, während im chronischen Modell die erniedrigten IgE-Spiegel mit der nicht induzierbaren AHR korrelierten. Eine genetisch determinierte Atemwegsreagibilität ohne Korrelation mit Atemwegseosinophilie

und IgE-Spiegeln wie von Wilder et al. postuliert, kann hierfür keine Erklärung liefern (Wilder et al. 1999). Nach Mayr et al. korreliert die AHR viel mehr mit den IgE-Spiegeln im Serum als mit der Atemwegseosinophilie (Mayr et al. 2002), was mit der vorliegenden Arbeit im Einklang steht. Eine enge Verbindung der AHR mit der akuten Atemwegsentzündung wie von De Jongste postuliert (De Jongste et al. 1991) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Die Atemwegseosinophilie spielt im Rahmen der chronischen Atemwegsentzündung eine weniger bedeutende Rolle als im akuten Asthma, da die Anzahl der Eosinophilen mit längerer Allergenprovokation sinkt (Kim et al. 2007, Schramm et al. 2004, Sakai et al. 2001). Auch im akuten Modell korreliert die Atemwegsentzündung scheinbar nicht mit der AHR: trotz signifikant erniedrigter Atemwegseosinophilie bestehen keine Unterschiede in der AHR zwischen wt- und ΔD -id-Tieren.

Neben dem IgE sind auch andere Mediatoren für die Entwicklung einer AHR verantwortlich. In Studien mit B-Zell-defizienten Mäusen konnten ebenso eine Atemwegseosinophilie und eine AHR induziert werden. Diese allergischen Veränderungen fanden also unabhängig von Antigen-spezifischen-Antikörpern statt. Als zentrales Effektormolekül wird IL-5 postuliert (Hamelmann et al. 1999). Neuere Studien zeigten jedoch, dass sich durch eine anti-IL-5-Behandlung die AHR nicht beeinflussen lässt (Holgate et al. 2005).

In Tieren mit einer hydrophilen CDR-H3-Region konnte keine AHR induziert werden. Dies spricht für einen entscheidenden Beitrag der CDR-H3-Region zur Entwicklung einer AHR.

5.3.4 Irreversibler Atemwegsumbau

Das *airway remodelling*, der irreversible Atemwegsumbau in der chronischen allergischen Atemwegsentzündung ist gekennzeichnet durch eine Verdickung der Alveolarwand, eine Zunahme an glatter Bronchialmuskulatur, eine Zunahme an Becherzellen und einen permanent reduzierten Atemwegsquerschnitt (Bousquet et al. 2000, Busse et al. 1999). In der quantitativen Histologie zeigte sich bei sensibilisierten Tieren eine signifikante

Zunahme des Becherzellanteils und dementsprechend auch eine Zunahme des Muzinvolumens pro Oberfläche. Diese Veränderung konnte sowohl in sensibilisierten wt- Tieren als auch in ΔD -id-Tieren beobachtet werden. Zwischen sensibilisierten wt- und ΔD -id-Tieren fanden sich jedoch keine Unterschiede. Die Ergebnisse des akuten Modells zeigten ebenso eine signifikante Zunahme des Becherzellanteils und des Muzinvolumens. Es ließen sich aber genauso wenig Unterschiede zwischen sensibilisierten wt- und ΔD -id-Tieren zeigen.

Zum einen scheinen Mastzellen eine wichtige Mediator- und Effektorfunktion zu übernehmen. Durch IL-4 und IL-13 können Mastzellen die glatte Bronchialmuskulatur zur Proliferation und zur Kontraktion anregen (Robinson 2004). Außerdem sollen Mastzellen nach IgE-Fc ϵ RI-Aggregation Amphiregulin produzieren können, was zu verstärkter Muzingenexpression in Bronchialepithelzellen führt (Okumara et al. 2005). ΔD -id-Tiere zeigten signifikant erniedrigte IgE-Spiegel. Dies müsste zuerst zu verminderter IgE-Fc ϵ RI-Aggregation führen, woraus eine verminderte Amphiregulin-Produktion resultiert, die wiederum zu einer verminderten Muzingenexpression führt. ΔD -id-Tiere unterschieden sich jedoch in der Ausprägung des *airway remodelling* nicht von den wt-Tieren.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus des *airway remodelling* stellt die T_H2-Aktivität und ihr aktivierender Einfluss auf eosinophile Granulozyten dar (Komai et al. 2003). Diese T_H2-Zellen sind charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 und durch ihr Zytokinprofil. Der Transkriptionsfaktor GATA-3 begünstigt eine Verschiebung eines T_H1-Milieus zugunsten eines T_H2-Milieus und stellt einen interessanten möglichen pharmakologischen Angriffspunkt dar (Sel et al. 2008).

Unter den Zytokinen spielen IL-5 und IL-4 eine bedeutende Rolle, da sie Aktivität und Überleben eosinophiler Granulozyten kontrollieren (Sel et al. 2008; Komai et al. 2003). Eosinophile Granulozyten wiederum stellen einen der wichtigsten Effektorzelltyp der allergischen Atemwegsentszündung dar (Maddox und Schwartz 2002). Durch ihre Mediatoren, vor allem das *major basic protein*, kann die Integrität des Bronchialepithels zerstört werden, wodurch erste

Umbauten der Atemwege induziert werden (Gleich 1990, Zagai et al. 2004). Durch den eosinophilen Mediator TGF- β (*transforming growth factor β*) werden Fibroblasten und Myofibroblasten aktiviert, die auch zum *airway remodelling* beitragen (Hashimoto et al. 2001).

Durch diesen engen Zusammenhang zwischen eosinophiler Atemwegsentzündung und *airway remodelling* stellt sich die Frage, ob dies zwei parallel ablaufende Prozesse sind oder ob eine Abhängigkeit zwischen ihnen besteht (Bush 2008). Zum einen ist das *airway remodelling* Folge eosinophiler Atemwegsentzündung, zum anderen scheinen Umbauten der Lunge bereits in frühen Lebensjahren ohne Atemwegsentzündung stattzufinden (Bush 2008). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich keine Aussagen darüber treffen, inwiefern die eosinophile Atemwegsentzündung mit dem *airway remodelling* in Zusammenhang steht.

Daneben scheinen die einzelnen Komponenten des *airway remodelling*, unterschiedliche Funktionen zu übernehmen. Die Basalmembranverdickung hat mitunter einen protektiven Charakter und schützt vor der Entwicklung einer AHR (Milanese et al. 2001). Die Zunahme von glatter Atemwegsmuskulatur hingegen wirkt sich eher negativ aus und geht mit einer verschlechterten Lungenfunktion einher (Benayoun et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte an diesem Punkt eine Dissoziation zwischen AHR und *airway remodelling* aufgezeigt werden. ΔD -id-Tiere zeigten im Gegensatz zu wt-Tieren keine AHR, unterschieden sich aber im Ausmaß des *airway remodelling* nicht von wt-Tieren.

Ein weiterer Aspekt in der Entstehung des *airway remodelling* ist der Einfluss von T_H2-Zellen ohne dazwischen geschaltete eosinophile Granulozyten als Mediatoren. Nach Ramos-Barbon et al. können antigenspezifische T_H2-Zellen im Rattenmodell direkt zu Proliferation und verminderter Apoptose von glatten Muskelzellen führen (Ramos-Barbón et al. 2005). Dieser Mechanismus könnte durchaus an der Entstehung des *airway remodelling* der untersuchten Mäuse beteiligt sein.

5.4 Schlussfolgerung

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CDR-H3-Region einen bedeutenden Einfluss auf bestimmte Aspekte des Asthma-Phänotyps nimmt.

Die systemische Sensibilisierung ist in beachtlichem Maße abhängig von der CDR-H3-Region: auch zwölf Wochen nach systemischer Sensibilisierung wurden bei Mäusen mit bevorzugt geladenen CDR-H3-Regionen (ΔD -id) signifikant verminderte OVA-spezifische und Gesamt-IgE-Spiegel gefunden. Hingegen scheint die CDR-H3-Region für die Ausbildung einer lokalen Entzündungsreaktion der Lunge und für das *airway remodelling* im chronischen Modell keine relevante Rolle zu spielen.

Einen umso bedeutenderen Einfluss hat die CDR-H3-Region jedoch auf die Ausbildung einer Atemwegsreagibilität. Auch nach zwölfwöchiger Allergenexposition konnte in sensibilisierten ΔD -id-Tieren keine AHR induziert werden.

Die zusammenfassende Schlussfolgerung der vorliegenden Dissertationsarbeit ist, dass die qualitative Zusammensetzung der klassischen Antigen-Bindungsstelle des Immunglobulins einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung wesentlicher phänotypischer Aspekte des allergischen Asthma besitzt. Über die signifikant verminderte allergische Sensibilisierung hinaus fand sich bei anhaltender Allergenexposition über einen Zeitraum von zwölf Wochen auch ein praktisch vollständiges Ausbleiben der AHR. Somit muss die Arbeitshypothese in Bezug auf die allergische Atemwegsentszündung und das *airway remodelling* verworfen werden. In Bezug auf die systemische Sensibilisierung und die AHR jedoch kann die Arbeitshypothese durch unsere Ergebnisse bestätigt werden.

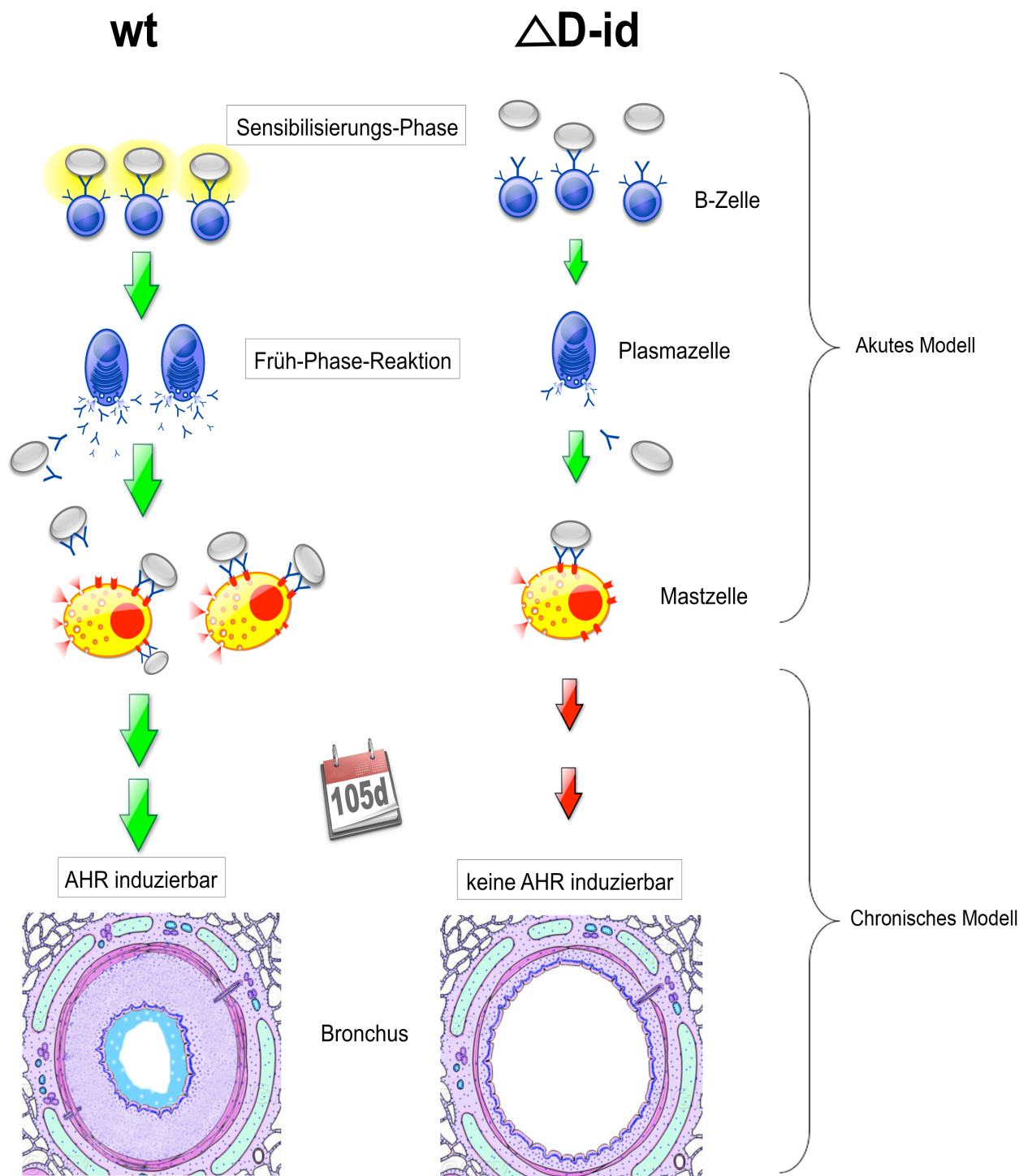


Abb. 37 Hypothetische Rolle der CDR-H3-Region in einem murinen Modell der chronisch allergischen Atemwegsentszündung

Quelle: Eigenanfertigung durch T. Ohletz, © T. Ohletz 2008

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Abbas A., Murphy K., Sher A. (1996) „Functional diversity of helper T lymphocytes“ Nature 383:787-793

Achatz G., Achatz-Straussberger G., Luger E., Lamers R., Cramer R. (2006) „Regulation of the IgE response at the molecular level: impact on the development of systemic anti IgE therapeutic strategies“ Chem Immunol Allergy 91:204-217

Akbari O., Stock P., Meyer E., Kronenberg M., Sidobre S., Nakayama T., Taniguchi M., Grusby M., DekKuyff R., Umetsu D. (2003) „Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity“ Nat Med 9:582

Akdis C. (2006) „Allergy and hypersensitivity – Mechanisms of allergic disease“ Curr Opin Immunol 18:718-726

Akinbami L. und Schoendorf K. (2002) „Trends in childhood asthma: prevalence, health care utilization, and mortality“ Pediatrics 110:315-322

American Thoracic Society (2000) „Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions“ Am J Respir Crit Care Med 162:2341–2351

Amin K., Janson C., Boman G., Venge P. (2005) „The extracellular deposition of mast cell products is increased in hypertrophic airways smooth muscles in allergic asthma but not in nonallergic asthma“ Allergy; 60:1241–1247

Angkasekwinai P., Park H., Wang Y., Wang Y., Chang S., Corry D., Liu Y., Zhu Z., Dong C. (2007) „Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses“ J Exp Med 204:1509-1517

Bach J. (2002) „Mechanisms of disease: the effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases“ N Engl J Med 347:911-920

Bacharier L. und Geha R. (2000) „Molecular mechanisms of IgE regulation“ J Allergy Clin Immunol 105:547-558

Barrios Y., Jirholt P., Ohlin M. (2004) „Length of the antibody heavy chain complementary region 3 as a specificity-determining factor“ J Mol Recognit 17:332-338

Begueret H., Berger P., Vernejoux J., Dubuisson L., Marthan R., Tunon-de-Lara J. (2007) „Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma“ Thorax 62:8–15

Benayoun L., Druilhe A., Dombret M., Aubier M., Pretolani M. (2003) „Airway structural alterations selectively associated with severe asthma“ Am J Respir Crit Care Med 167:1360-1368

Benedict C., Gilfillan S., Thai T., Kearney J. (2000) „Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development“ Immunol Rev 175:150-157

Beth A., Rada C., Pannell R., Milstein C., Neuberger M. (1993) „Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots“ Proc Natl Acad Sci USA 90:2385-2388

Böttcher M., Häggström P., Björkstén B., Jennalm M. (2002) „Total and allergen-specific immunoglobulin A levels in saliva in relation to the

development of allergy in infants up to 2 years of age“ Clin Exp Allergy 32:1293–1298

Bousquet J., Ansotequi I., van Ree R., Burney P., Zuberbier T., van Cauwenberge P. (2004) „European Union meets the challenge of the growing importance of allergy and asthma in Europe“ Allergy 59:1–4

Bousquet J., Bieber T., Fokkens W., Humbert M., Kowalski M., Niggemann B., Simon H. (2006) „Themes in allergy“ Allergy 61:1–2

Bousquet J., Cabrera P., Berkman N., Buhl R., Holgate S., Wenzel S., Fox H., Hedgecock S., Blogg M., Cioppa G. (2005) „The effect of treatment with omalizumab, an anti-IgE antibody, on asthma exacerbations and emergency medical visits in patients with severe persistent asthma“ Allergy 60:302-308

Bousquet J., Chiron R., Humbert M. (2008) „Biologics in asthma: difficulties and drawbacks“ Expert Opin Biol Ther 8:1921-1928

Bousquet J., Jeffery P., Busse W., Johnson M., Vignola A. (2000). „Asthma“ Am J Respir Crit Care Med 161:1720–1745

Bouvet J. und Marone G. (2007) „Protein Fv: an endogenous immunoglobulin superantigen and superallergen“ Chem Immunol Allergy 93:58-76

Bradding P., Roberts J., Britten K., Montefort S., Djukanovic R., Mueller R., Heusser C., Howarth P., Holgate S. (1994) „Interleukin -4, -5 and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines“ Am J Respir Cell Mol Biol 10:471-480

Braden B., Goldman E., Mariuzza R., Poljak R. (1998) „Anatomy of an antibody molecule: structure, kinetics, thermodynamics and mutational studies of the anitlysozyme antibody D1.3“ Immunol Rev 163:45-57

Brown J., Wilson T., Metcalfe D. (2008) „The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy“ Clin Exp Allergy 38:4–18

Burrows B., Martinez F., Halonen M., Barbee R., Cline M. (1989).“Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergen” N Engl J Med 320:271-277

Bush A. (2008) „How early do airway inflammation and remodeling occur?“ Allergol Int 57:11-19

Busse W., Elias J., Sheppard D., Banks-Schlegel S. (1999) „Airway remodeling and repair“ Am J Respir Crit Care Med 160:1035–1042

Busse W. und Lemanske F. (2001) „Asthma“ N Engl J Med 344:350–362

Chetta A., Foresi A., Del Donno M., Bertorelli G., Pesci A., Olivieri D. (1997) „Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease“ Chest 111:852-857

Cockcroft D. und Davis B. (2006) „Mechanisms of airway hyperresponsiveness“ J All Clin Imm 118:551–559

Coffman R. und Carty J. (1986) „A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon- γ “ J Immunol 136:949

Coker H., Harries H., Banfield G., Carr V., Durham S., Cheffretton E., Hobby P., Sutton B., Gould H. (2005) „Biased use of CH5 IgE-positive B cells in the nasal mucosa in allergic rhinitis“ J Allergy Clin Immunol 116:445-452

Collis A., Brouwer A., Martin A. (2003) „Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen“ J Mol Biol 325:337-354

Cookson W. und Moffatt M. (2004) „Making sense of asthma genes“ N Engl J Med 351:1794-1796

Corry D. und Kheradmand F. (1999) „Induction and regulation of the IgE response“ Nature 402:18-23

Dakhama A., Lee Y., Gelfand E. (2005) „Virus induced airway dysfunction: pathogenesis and biomechanisms“ Pediatr Infect Diss J 24:159-169

Davies D. und Chacko S. (1993) „Antibody structure“ Acc Chem Res 26:421-427

Davies J. und O’Hehir R. (2004) „VH gene usage in immunoglobulin E responses of seasonal rhinitis patients allergic to grass pollen is oligoclonal and antigen driven“ Clin Exp Allergy 34:429-436

Davies D., Wicks J., Powell R., Puddicombe S., Holgate S. (2003) „Airway remodeling in asthma: New insights“ J Allergy Clin Immunol 111:215-225

Decanniere K., Muyldermans S., Wyns L. (2000) „Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes?“ J Mol Biol 300:83-91

Djukanovic R., Wilson S., Kraft M., Jarjour N., Steel M., Chung K., Bao W., Fowler-Taylor A., Matthews J., Busse W., Holgate S., Fahy J. (2004) „Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma“ Americ J of respirator critical care medicine 170:583-593

Domati-Saad R., Attrep J., Brezinschek H., Cherrie A., Karp D., Lipsky P. (1996) „Staphylococcal enterotoxin D functions as a human B cell superantigen by rescuing VH4-expressing B cells from apoptosis“ J Immunol 156:3608-3620

Edwards M., Brouwer W., Choi C., Ruhno J., Ward R., Collins A. (2002) „Analysis of IgE antibodies from a patient with atopic dermatitis: biased V gene usage and evidence for polyreactive IgE heavy chain complementarity-determining region 3“ J Immunol 168:6305-6313

Elias J., Zhu Z, Chupp G., Homer R. (1999) „Airway remodeling in asthma“ J Clin Invest 104:1001-1006

Epstein M. (2004) „Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease?“ Int Arch Allergy Immunol 133:84-100

Fanning L., Connor A., Wu G. (1996) „Development of the immunoglobulin repertoire“ Clin Immunol Immunopathol 79:1-14

Fireman P. (2003) „Understanding asthma pathophysiology“ Allergy Asthma Proc 24:79-83

Fischer P., Bonow I., Supali T., Rückert P., Rahmah N. (2005) „Detection of filaria-specific IgG4 antibodies and filarial DNA, for the screening of blood spots for Brugia timori“ Ann Trop Med Parasitol 99:53–60

Gauss G. und Lieber M. (1996) “Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination” Mol Cell Biol 16:258-269

Gavett S. und Wills-Karp M. (1993) „Elevated lung G protein levels and uscarinic receptor affinity in a mouse model of airway hyperreactivity“ Am J Physiol 265:493-500

Gibson G., Simpson J., Saltos N. (2001) „Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8“ Chest 119:1329–1336

Glaab T. (1999) „Etablierung und Validierung eines nicht-invasiven Head-out-Bodyplethysmographie-Systems zur Messung der Atemwegsreaktivität in der allergisierten Maus“ Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

Glaab T., Daser A., Braun A., Neuhaus-Steinmetz U., Fabel H., Alarie Y., Renz H. (2001) „Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice“ Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 280:565–573

Gleich G. (1990) „The eosinophil and bronchial asthma: current understanding“ J Allergy Clin Immunol 85:422–436

Gleich G. und Kita H. (1997) „Bronchial asthma: lessons from a murine models“ Proc Natl Acad Sci USA 94:2101-2102

Gould H., Sutton B., Beavil A., Beavil R., McCloskey N., Coker H., Fear D., Smurthwaite L. (2003) „The biology of IgE and the basis of allergic disease“ Annu Rec Immunol. 21:579-628

Gould H., Takhar P., Harries H., Durham S., Corrigan C. (2006) „Germinal-centre reactions in allergic inflammation“ Trends Immunol 27:446-452

Haldar P. und Pavord I. (2007) „Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype“ J Allergy Clin Immunol 199:1043-1052

Hamelmann E., Takeda K., Schwarze J., Vella A., Irvin C., Gelfand E. (1999). „Development of Eosinophilic Airway Inflammation and Airway Hyperresoniveness requires Interleukin 5 but not Immunoglobulin E of B Lymphocytes“ Am J Respir Cell Mol Biol 21:489–489

Hamelmann E., Takeda K., Oshiba A., Gelfand E. (1999) „Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness – a murine model“ Allergy 54:297–305

Hargreave F., Dolovich J., O'Byrne P., Ramsdale E., Daniel E. (1986) „The origin of airway hyperresponsiveness“ J All Clin Imm 78:825–832

Hashimoto S., Gon Y., Takeshita I., Matsumoto K., Maruoka S., Horie T. (2001) „Transforming growth Factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway“ Am J Respir Crit Care Med 163:152–157

Hellings P., Kasra A., Kiu Z., Vandekerckhove P., Wuyts A., Overbergh L., Mathieu C., Ceuppens J. (2003) „Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma“ Am J Respir Cell Mol Biol 28:42-50

Herz U., Braun A., Rückert R., Renz H. (1997) „Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness“ Clin Exp All 28:625–634

Holt P. (2000) „Antigenpresentation in the lung“ Am J Respir Crit Care Med 162:151–156

Holgate S., Casale T., Wenzel S., Bousquet J., Deniz Y., Reisner C. (2005) „The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation“ J all clin immunol 115:459-465

Holgate S., Peters-Golden M., Panettieri R., Henderson W. (2003) „Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling“ J Allergy Clin Immunol 111:18-34

Ippolito G., Schelonka R., Zemlin M., Ivanov I., Kobayashi R., Zemlin C., Gartland G., Nitschke L., Pelkonen J., Fujihashi K., Rajewsky K., Schroeder H. (2006) „Forced usage of positively charged amino acids in immunoglobulin CDR-H3 impairs B cell development and antibody productions” J Exp Med 203:1568–1578

Itami M., Latinne D., Bazin H., Garcia M., Perini A., Martins M., Macedo M., Macedo-Soares M. (2003) „Immunoglobulin E is not required for but enhances airway inflammation and hyperresponsiveness“ Allergy 58:1117–1124

Ivanov I., Schelonka R., Zhuang Y., Gartland G., Zemlin M., Schroeder H. (2005) „Development of the expressed Ig CDR-H3 repertoire is marked by focusing of constraints in length, amino acid use, and charge that are first established in early B cell progenitors” J Immunol 174:7773-7780

James L., Roversi P., Tawfik D. (2003) „Antibody multispecificity mediated by conformational diversity” Science 299:1362-1367

Janeway C. (2005) “Immunology” 6. Auflage, New York, Tokyo, Hampshire

De Jongste J., Jongejan R., Kerrebijn K. (1991) „Control of airway caliber by autonomic nerves in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease“ Am Rev Respir Dis 143:1421-1426

Kauffman H., Tomee J., van de Riet M., Timmerman A., Borger P. (2000) „Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production” J Allergy Clin Immunol 105:1185-1193

Kim S., Kim C., Ahn J., Kim M., Kim S., Lee S., Kwon S., Kim Y., Kim K., Moon H., Song J., Park S. (2007) „Time sequence of airway remodeling in a mouse model of chronic asthma: the relation with airway hyperresponsiveness“ J Korean Med Sci 22:183-191

Kinet J. (1999) "The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology" Annu Rev Immunol 17:93

Kerzel S., Wagner J., Rogosch T., Yildirim A., Sikula L., Fehrenbach H., Garn H., Maier R., Schroeder H., Zemlin M. (2009) „Composition of the immunoglobulin classic antigen-binding site regulates allergic airway inflammation in a murine model of experimental asthma“ Clin Exp Allergy 39:591-601

Komai M., Tanaka H., Masuda T., Nagao K., Ishizaki M., Sawada M., Nagai H. (2003) „Role of TH2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma“ Br J Pharmacol 138:912–920

Krug N., Tschernig T., Erpenbeck V., Hohlfeld J., Köhl J. (2001) „Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma.“ Am J Respir Crit Care Med 164:1841–1843

Laffer S., Steinberger P., Kraft D., Valenta R. (2001) „Promiscuous use of light chains by human IgE antibodies specific for three major grass pollen allergens“ Int Arch Allergy Immunol 124:29-30

Lane S. und Lee T. (1997) „Mast cell effector mechanisms“ J Allergy Clin Immunol 98:67–72

Larché M. (2007) „Regulatory T-cells in allergy and asthma“ Chest 132:1007-1014

Larché M., Robinson D., Kay A. (2003) „The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma“ J Allergy Clin Immunol 111:450-463

Leong K. und Huston D. (2001) "Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse models" Ann Allergy Asthma Immunol 87: 96-109

Leckie M., ten Brinke A., Khan J., Diamant Z., O'Connor B., Walls C., Mathur A., Cowley H., Chung K., Djukanovic R., Hansel T., Holgate S., Sterk P., Barnes P. (2000) „Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response“ Lancet 356:2144-2148

Lim A., Luderschmidt S., Weidinger A., Schnopp C., Ring J., Hein R., Ollert M., Mempel M. (2007) „The IgE repertoire in PBMCs of atopic patients is characterized by individual rearrangements without variable region of the heavy immunoglobulin chain bias.“ J Allergy Clin Immunol 120:696-706

Locksley R. (1994) „TH2 cells: help for helminths“ J Exp Med 179:1405–1407

Los H., Koppelman G., Postma D. (1999) „The importance of genetic influences in asthma“. Eur Respir J 14:1210–1227

Maddox L. und Schwartz D. (2002) „The pathophysiologie of asthma“ Annu Rev Med 53:477-498

Mariassy A. (1992) „Epithelial cells of trachea and bronchi“ Comparative biology of the normal lung 63-83

Marone G., Spadaro G., Liccardo B., Rossi F., D'Orio C., Detoraki A. (2006) „Superallergens: a new mechanism of immunologic activation of human basophils and mast cells“ Inflamm Res. 55:25-27

Marone G., Rossi F., Detoraki A., Granata F., Marone G., Genovese A., Spadaro G. (2007) „Role of Superallergens in Allergic Disorders“ Chem Immunol Allergy 93:195-213

Mayr S., Zuberi R., Zhang M., de Sousa-Hitzler J., Ngo K., Kuwabara Y., Yu L., Fung-Leung W., Liu F. (2002) „IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models“ J Immunol 169:2061-2068

McMillan S. und Lloyd C. (2004) „Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling“ Clin Exp Allergy 34:497-507

Milanese M., Crimi E., Scordamaglia A., Riccio A., Pellegrino R., Canonica G., Brusasco V. (2001) „On the functional consequences of bronchial basement membrane thickening“ J Appl Physiol 91:1035-1040

Min B. und Paul W. (2008) „Basophils and type 2 immunity“ Curr Opin Hematol 15:59-63

Mine Y. und Rupa P. (2003) „Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin“ Protein engineering 16:747-752

Mine Y. und Yang M. (2007) „Epitope characterization of ovalbumin in BALB/c mice using different entry routes“ Biochimica et biophysica acta 1774:200-212

Nationale Versorgungs-Leitlinie Asthma (2005)

Nath P., Leung S., Williams A., Noble A., Xie S., McKenzie A., Chung K. (2007) „Complete inhibition of allergic airway inflammation and remodelling in quadruple IL-4/5/9/13-mice“ Clin Exp Allergy 37:1427–1435

Noah T. und Becker S. (2000) „Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus“ Clin Immunol 97:43-49

Nola J. und Neuberger M. (2007) „Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation“ Annu Rev Biochem 76:1-22

Nowak D. (2006) „Management of asthma with anti-immunglobulin E: a review of clinical trials of omalizumab“ Respir Med 100:1907-1917

Okumura S., Sagara H., Fukuda T., Saito H., Okayama Y. (2005) „FcεpsilonRI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells.“ J Allergy Clin Immunol 115:272–279

Pabst R. und Tschernig T. (2002) „Perivascular capillaries in the lung: an important but neglected vascular bed in immune reactions?“ J Allergy Clin Immunol 110:209-214

Pavia D., Bateman J., Sheahan N., Agnew J., Clarke S. (1985) „Tracheobronchial mucociliary clearance in asthma: impairment during remission“ Thorax 40:171-175

Pène J., Rousset F., Brière F., Chrétien I., Bonnefoy J., Spits H., Yokota T., Arai N., Arai K., Banchereau J. (1988) „IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons α, γ and prostaglandin E₂“ J Immunol. 141:1218-1224

Pham-Thi N., de Blic J., Le Bourgeois M., Dy M., Scheinmann P., Leite-de-Moraes M. (2006) „Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma“ J All Clin Immunol 117:217-218

Qin X., Xiang Y., Liu C., Tan Y., Qu F., Peng L., Zhu X., Qin L. (2007) „The role of bronchial epithelial cells in airway hyperresponsiveness“ Acta Physiologica Sinica 59:454-464

Rajewsky K. (1996) „Clonal selection and learning in the antibody system“ Nature 381:751-758

Ramos-Barbón D., Presley J., Hamid W., Fixman E., Martin J. (2005) „Antigen-specific CD4⁺ T cells drive airway smooth muscle remodelling in experimental asthma“ J Clin Invest 115:1580-1589

Reed C. (2006) „The natural history of asthma“ J Allergy Clin Immunol 118:543-548

Reed M. und Howard W. (1998) „Unbiased stereology – Three-Dimensional measurement in microscopy“ Bios Scientific Publishers, Oxford, UK

Renz H., Smith H., Henson J., Ray B., Irvin C., Gelfand E. (1992) „Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased responsiveness in the mouse“ J Allergy Clin Immunol 89:1127-1138

Reuter S. und Taube C. (2008) „Mast cells and the development of allergic disease“ J Occup Med Toxicol 27:2

Robinson D. (2004) „The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle?“ J Allergy Clin Immunol 114:58-65

Romagnani (2004) „Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance“ J Allergy Clin Immunol 113:395-400

Rothenberg M. (1998) „Eosinophilia“ N Engl J Med 338:1592 –1600

Sakai K., Yokoyama A., Kohno N., Hamada H., Hiwada K. (2001) „Prolonged antigen exposure ameliorates airway inflammation but not remodeling in a mouse model of bronchial asthma“ Int Arch Allergy Immunol 126:126-134

Satinover S., Reefer A., Pomes A., Chapman M., Platts-Mills T., Woodfolk J. (2005) „Specific IgE and IgG antibody-binding patterns to recombinant cockroach allergens“ J Allergy Clin Immunol 115:803-809

Schelonka R., Ivanov I., Ippolito G., Nitschke L., Zhuang Y., Gartland G., Pelkonen J., Alt F., Rajewsky K., Schroeder H. (2005) „A Single D_H Gene

Segment Creates Its Own Unique CDR-H3 Repertoire and Is Sufficient for B cell Development and Immune Function“ J Immunol 175:6624-6632

Schmidt-Weber C., Akdis M., Akdis C. (2007) „T_H17 cells in the big picture of immunology“ J Allergy Clin Immunol 120:247-254

Van Schoor J., Joos G., Pauwels R. (2000) „Indirect bronchial hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, pharmacology and implications for clinical research“ European Respiratory Journal 16:514-533

Schnyder-Candrian S., Togbe D., Couillin I., Mercier I., Brombacher F., Quesniaux V., Fossiez F., Ryffel B., Schnyder B. (2006) „Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma“ J Exp Med 203:2715-2725

Schramm C., Puddington L., Wu C., Guernsey L., Gharaee-Kermani M., Phan S., Thrall R. (2004) „Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease“ Am J Pathol 164:295-304

Schroeder H., Ippolito G., Shiokawa S. (1998) „Regulation of the antibody repertoire through control of HCDR3 diversity“ Vaccine 16:1383-1390

Sel S., Wegmann M., Dicke T., Sel S., Henke W., Yildirim A., Renz H., Garn H. (2008) „Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNAzyme“ J Allergy Clin Immunol 121:910-916

Soto-Quiros M., Soto-Martinez M., Hanson L. (2002) „Epidemiological studies of the very high prevalence of asthma and related symptoms among school children in Costa Rica from 1989 to 1998“ Pediatr Allergy Immunol 13:342-349

Sumi Y. und Hamid Q. (2007) „Airway remodelling in asthma“ Allergol Int 56:341-348

Tagaya E. und Tamaok J. (2007) „Mechanisms of airway remodelling in asthma“ Allergol Int. 56:331-340

Thiebe R., Schäble K., Bensch A., Brensing-Küppers J., Heim V., Kirschbaum T., Mitlöhner H., Ohnrich M., Pourrajabi S., Rösenthaller F., Schwendinger J., Wichelhaus D., Zocher I., Zachau H. (1999) „The variable genes and gene families of the mouse immunoglobulin kappa locus“ Eur J Immunol 29:2072-2081

Thomas W., Smith W., Hales B. (1998) „House dust mite allergen characterisation: implications for T-cell responses and immunotherapie“ Int Arch Allergy Immunol 115:9-14

Tonegawa S. (1983) „Somatic generation of antibody diversity“ Nature 302:575-581

Trautmann A., Kruger K., Akdis M., Muller-Wening D., Akkaya A., Brocker E., Blaser K., Akdis C. (2005) „Apoptosis and loss of adhesion of bronchial epithelial cells in asthma“ Int Arch Allergy Immunol 138:142–150

Venkatesha R., Berla Thangam E., Zaidi A., Ali H. (2005) „Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase“ Mol Immunol 42:581–587

Virchow C. (2005) „Asthma bronchiale – Diagnostik und Therapie“ in Medizinische Therapie 2005/2006 Springer, Berlin, Heidelberg

Walker C., Bauer W., Braun R., Menz G., Braun P., Schwarz F., Hansel T., Villiger B. (1994) „Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia“ Am J Respir Crit Care Med 150:1038-1048

Wan T., Beavil R., Fabiane S., Beavil A., Sohi M., Keown M., Young R., Henry A., Owens R., Gould H., Sutton B. (2002) „The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation“ Nat Immunol 3:681-686

Wegmann M., Fehrenbach H., Fehrenbach A., Held T., Schramm C., Garn H., Renz H. (2005) „Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma“ Clin Exp Allergy 35:1263–1271

Wenzel S., Szeffler S., Leung D., Sloan S., Rex M., Martin R. (1997) „Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflammation associated with high dose corticosteroids“. Am J Respir Crit Care Med 156:737-743

Williams C. und Galli S. (2000) „The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease“ J Allergy Clin Immunol 105:847–859

Wilder J., Collie D., Wilson B., Bice D., Lyons C., Lipscomb M. (1999) „Dissociation of Airway Hyperresponsiveness from Immunoglobulin E and Airway Eosinophilia in a Murine Model of Allergic Asthma“ Am J Respir Cell Mol Biol 20:1326-1334

Wills-Karp M., Santeliz J., Karp C. (2001) „The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis“. Nat Rev Immunol 1:69–75

Wilson I. und Stanfield R. (1994) „Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes“ Curr Opin Struct Biol 4:857-867

Xu J. und Davis M. (2000) „Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities“ Immunity 13:37–45

Zagai U., Sköld C., Trulsson A., Venge P., Lundahl J. (2004) „The effect of eosinophils on collagen gel contraction and implications for tissue remodelling“ J Exp Immunol 135:427-433

Zosky G., Larcombe A., White O., Burchell J., Janosi T., Hantos Z., Holt P., Sly P., Turner D. (2007) „Ovalbumin-sensitized mice are good models for airway hyperresponsiveness but not acute physiological responses to allergen inhalation“ Clin Exp Allergy 38:829-838

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Mastzelle	13
Abb. 2: Das Antikörpermolekül	19
Abb. 3: Die Entstehung der Antikörpervielfalt	20
Abb. 4: Das Antikörpermolekül	22
Abb. 5: Gelelektrophorese	32
Abb. 6: Sensibilisierungsprotokoll	33
Abb. 7: Versuchsaufbau der inhalativen Provokation	34
Abb. 8: Blutentnahme bei der Maus	34
Abb. 9: Prinzip des Sandwich-ELISA	36
Abb. 10: Lichtmikroskopische Vergrößerung der BALF	39
Abb. 11: Messprinzip der Bodyplethysmographie	40
Abb. 12: Atemmuster	40
Abb. 13: Versuchsaufbau Bodyplethysmographie (1)	41
Abb. 14: Versuchsaufbau Bodyplethysmographie (2)	42
Abb. 15: Punkt- und Liniengitter	43
Abb. 16: Lungeninstallation	44
Abb. 17: IgM Serumspiegel in wt-Tieren	47
Abb. 18: IgM Serumspiegel in ΔD -id und ΔD -DFL-Tieren	48
Abb. 19: IgG ₁ Serumspiegel in wt-Tieren	49
Abb. 20: IgG ₁ Serumspiegel in ΔD -id und ΔD -DFL-Tieren	50
Abb. 21: IgE Serumspiegel in wt-Tieren	51
Abb. 22: IgE Serumspiegel in ΔD -id und ΔD -DFL-Tieren	52
Abb. 23: IgG2a Serumspiegel in wt-Tieren	53
Abb. 24: IgG2a Serumspiegel in ΔD -id und ΔD -DFL-Tieren	54
Abb. 25: Serumspiegel OVA spez. IgE in wt-Tieren	55
Abb. 26: Serumspiegel OVA spez. IgE in ΔD -id und ΔD -DFL-Tieren	56
Abb. 27: Eosinophile Granulozyten in wt- Tieren in der BALF	57
Abb. 28: Eosinophile Granulozyten in der BALF	58
Abb. 29: Methacholin-Response in wt-Tieren	60
Abb. 30: Methacholin-Response in ΔD -id-Tieren	61
Abb. 31: Methacholin-Response in ΔD -DFL-Tieren	61
Abb. 32: PC ₅₀ -Werte ΔD -id- und wt-Tiere	62

Abb. 33: PC50-Werte Δ D-DFL- und wt-Tiere	63
Abb. 34: Becherzellanteil der Lungen in wt- und Δ D-id-Tieren	64
Abb. 35: Lungenquerschnitte wt-Tiere	65
Abb. 36: Lungenquerschnitte Δ D-id-Tiere	65
Abb. 37: Hypothetische Rolle der CDR-H3-Region in murinen Modell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung	78

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: T _H -Zelltypen	11
Tab. 2: Reaktionsansatz der Genotypisierung - PCR	30
Tab. 3: Primer der Genotypisierung - PCR	31
Tab. 4: PCR Cyclor-Schema	31
Tab. 5: Tiergruppen	33
Tab. 6: Konzentration der Reagenzien für die Immunglobulin-ELISA	37
Tab. 7: Verneblungsprotokoll der Methacholin-Provokation	42
Tab. 8: Zellverteilung der BALF	59

6.4 Abkürzungsverzeichnis

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
CDR-H3	complementarity determining region 3 der schweren Kette
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Ig(E, G ₁ , M)	Immunglobuline (E, G ₁ , M)
MEF ₅₀	<i>midexpiratory airflow</i> bei 50% des mittleren Volumens
OVA	Ovalbumin
PC ₅₀	<i>provocation concentration</i> ; Konzentration Methacholin, die einen 50%igen Abfall des MEF ₅₀ verursacht
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
V _H -, D _H -, J _H -segment	variable, diversity, joining Segmente der schweren Kette des Immunglobulinmoleküls
wt	Wildtyp

6.5 Eigene Publikationen zum Thema

Originalarbeiten:

Kerzel S., Rogosch T., Wagner J., Preißer K., Yildirim A., Fehrenbach H., Garn H., Maier R., Schroeder H. Jr, Zemlin M. (2011) "A single DH gene segment is sufficient for the establishment of an asthma phenotype in a murine model of allergic airway inflammation" Int Arch Allergy Immunol In press 2011 (JIF 2009:2,542)

Kongressbeiträge:

Kerzel S., Preißer K., Rogosch T., Schroeder H. Jr, Maier R., Zemlin M. (2008) „The airway hyperreactivity in a murine model of chronic asthma is prevented by modifications of the classical antigen-binding site (CDR-H3)“ European Society of Pediatric Research (ESPR) in Nizza; Arch Dis Child. 93(Suppl II)

Kerzel S., Rogosch T., Wagner J., Preißer K., Strücker B., Sikula L., Schroeder H. Jr, Zemlin M., Maier R. (2009) „Allergic airway inflammation is regulated by the composition of the classical antigen-binding site“ Arbeitstage für Pädiatrische Forschung in Göttingen, Eur J Pediatr 168(3):377

Kerzel S., Preißer K., Rogosch T., Schroeder H. Jr, Maier R., Zemlin M. (2010) „Die Atemwegshyperreagibilität in einem Mausmodell des allergischen Asthma wird durch Modifikationen der klassischen Antigen-Bindungsstelle verhindert“ Jahrestagung der Süddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (SGKJ) in Marburg; Klin Padiatr. 222:102

6.6 Englische Zusammenfassung

Immunoglobuline E (IgE) is a central effector molecule in allergic immune responses. Bound to mast cells, IgE generates the immunological interface between allergen and immune system. It has been demonstrated that modifications of the classical antigen binding-site (CDR-H3) have significant impact on the asthma phenotype in a murine model of acute allergic airway inflammation. However, the airway hyperreactivity remained unaffected.

Therefore, the objective of this study was to determine the impact of qualitative changes in the CDR-H3 in a chronic model of allergic asthma. Transgenic mice with preferentially charged CDR-H3 (Δ Did-mice) were sensitized to ovalbumin. Subsequently, chronic airway inflammation was induced by 22 consecutive challenges with aerosolic ovalbumin over a period of 104 days. Δ Did-mice were compared to wildtype mice (*wt*) and to non-sensitized controls.

Δ Did- and *wt* mice showed a significant rise in total serum IgE during allergic sensitization. However, this rise was alleviated in Δ Did-mice. This attenuation was reflected in ovalbumin-specific IgE levels. In Δ Did-mice, the rise in allergen-specific IgE levels was reduced. Moreover, Δ Did-mice showed a diminished count of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluids compared to *wt*. To assess lung function, head-out body plethysmography was used. Sensitized *wt* mice developed dose-dependent airway hyperresponsiveness to methacholine. In contrast, in Δ Did-mice the airway hyperresponsiveness was completely abolished.

In conclusion, modifications of the CDR-H3-region significantly attenuate the asthma phenotype in a murine model of chronic allergic airway inflammation. The airway hyperreactivity even is prevented by a modification of the CDR-H3-region.

6.7 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Herren Dr. Kerzel, Prof. Dr. Maier, Prof. Dr. Maisch, PD Dr. Martin, Prof. Dr. Moosdorf, Prof. Dr. Dr. Oertel, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Vogelmaier und Dr. Werner.

In Visp, Schweiz die Damen und Herren Dr. Evequoz, Dr. Mengis und Dr. Schwery. In Kassel die Damen und Herren Dr. Herrmann, Dr. Müller, Dr. Rodehüser und Prof. Dr. Tegtmeyer. In Berlin Spandau die Herren PD Dr. Jochum und Dr. Lange. In Frankfurt a. M. die Herren Dr. Bühler und Dr. Walter.

6.8 Danksagung

In erster Linie danke ich herzlich Dr. Sebastian Kerzel für die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung in den letzten Jahren. Er war stets bereit zur Hilfe bei den praktischen Versuchsdurchführungen und der Erstellung des Manuskripts, was mit dieser Zeitintensität sicherlich nicht selbstverständlich ist. Bei Herrn Prof. Maier möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie die hilfreiche wissenschaftliche Diskussion bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei Arbeitsgruppenleiter Dr. Michael Zemlin für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen bedanken. Zu diesen Arbeitsbedingungen trugen ausserdem in herausragendem Maße Regina Stöhr und Sabine Jennemann bei, die mir bei den Laborarbeiten uneingeschränkt mit Rat und Tat zur Seite standen. Bei Tobias Rogosch möchte ich mich zusätzlich zur Hilfe bei praktischen Laborarbeiten für die Unterstützung bei EDV und Formatierungsangelegenheiten danken.

Diese Arbeit entstand in Kooperation mit der AG Fehrenbach, die die histologischen Schnitte und die Auswertung der quantitativen Histologie durchführten. Dafür möchte ich mich recht herzlich bedanken. Insbesondere geht mein Dank an Herrn Dr. Ali Önder und Herrn Dr. Fehrenbach, die mich in die Arbeitsschritte der Histologie einführten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Sie haben mich allzeit in jeder Hinsicht unterstützt und auf meinem Weg ermutigt. Meinem Verlobten Tim danke ich sehr für die Erstellung der sehr hilfreichen und gelungenen Grafiken meiner Arbeit. Ohne seine fachliche und EDV-technische Hilfe, sowie vor allem auch die menschliche Unterstützung wäre diese Arbeit so nicht zustande gekommen.